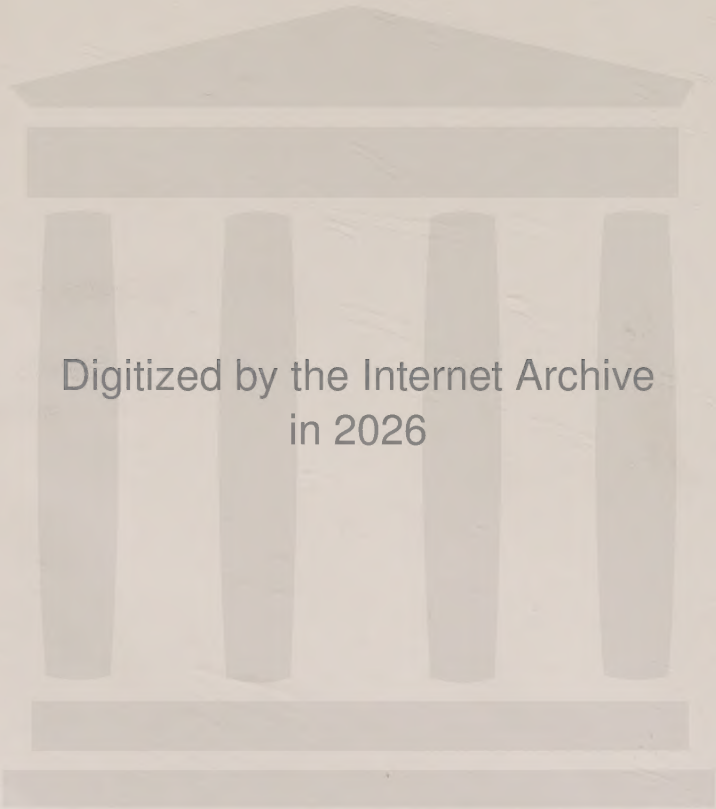
Untersuchungen zur Inhaltsstoffführung der Blüten von Arnica chamissonis Less. ssp. genuina Maguire und Arnica sachalinensis (Regl.) A. Gray

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
INGRID JUNIOR
aus Aachen

Düsseldorf
1983


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535714_0052

Untersuchungen zur Inhaltsstofführung der Blüten von Arnica chamissonis Less. ssp. genuina Maguire und Arnica sachalinensis (Regl.) A. Gray

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
INGRID JUNIOR
aus Aachen

Düsseldorf
1983

Referent: Prof. Dr. G. Willuhn

Korreferent: Prof. Dr. L. Birkofer

Tag der mündlichen Prüfung: 14.1.1983

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Professor Dr. G. Willuhn am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Düsseldorf durchgeführt.

Meinem Lehrer und Doktorvater

Herrn Professor Dr. G. Willuhn

danke ich herzlich für die stets hilfreiche Betreuung meiner Arbeit, für die Unterstützung und Förderung im wissenschaftlichen und persönlichen Bereich, sowie für die mir jederzeit entgegengebrachte Großzügigkeit!

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meinen Eltern

und Willibert

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	Einleitung und Problemstellung	1
B.	Untersuchungen zur Sesquiterpenlactonführung der Blütenkörbchen von Arnica chamissonis Less. ssp. genuina Maguire	11
	I. DC - Analyse und Fraktionierung der Sesquiterpenlactonfraktion	11
	II. Isolierung und Identifizierung der Sesquiterpenlactone	14
	1. Isolierung und Identifizierung von 2-Desacetyl-6-desoxychamissonolid (= Neopulchellin)	14
	2. Isolierung und Identifizierung von 2-Desacetylchamissonolid	21
	3. Isolierung und Identifizierung von Chamissonolid	29
	4. Identifizierung von 4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid	30
	5. Isolierung und Identifizierung von 11,13-Dihydrohelenalin	32
C.	Untersuchungen zur Inhaltsstofführung der Blütenkörbchen von A. sachalinensis (Regl.) A. Gray	35
	I. Extraktion der Blüten, DC - Analyse und Fraktionierung des Extraktes	35
	II. Isolierung und Identifizierung von Substanz C (6-Acetyl-2,2-dimethyl-2H-chromen = Desmethoxy-encecalin)	39

Seite

III. Isolierung und Identifizierung von Thymol und einzelner Thymolderivate 47

1. Isolierung und Identifizierung von Thymol (Substanz B) 47

2. Isolierung und Identifizierung von Thymolisobutyrat (Substanz A) 48

3. Isolierung und Identifizierung von Substanz D (10-Acetoxy-8,9-epoxy-thymol-isobutyrat) 50

4. Isolierung und Identifizierung von Substanz F (10-Acetoxy-8-hydroxy-9-isobutyryloxy-thymol) 59

5. Isolierung und Charakterisierung der Substanz E 67

IV. Wahrscheinliche Ursache des Fehlens von Sesquiterpenlactonen in den Blütenkörbchen von A. sachalinensis 74

D. Diskussion 81

E. Zusammenfassung 90

F. Experimenteller Teil 93

I. Spektroskopische Methoden 93

II. Bestimmung der physikalischen Konstanten 94

III. Chromatographische Methoden 94

1. Dünnschichtchromatographie 94

1.1. Analytische Dünnschichtchromatographie 94

1.2. Präparative Dünnschichtchromatographie 94

Seite

1.3. Fließmittel 95

1.4. Detektionsverfahren 96

2. Säulenchromatographie 98

3. Gaschromatographie 98

3.1. GC der Sesquiterpenlactone 99

3.2. GC der Thymolderivate und des Chromenderivates 99

3.3. GC des ätherischen Öles von Arnica sachalinensis 100

3.4. GC der Estersäuren 100

4. Hochdruckflüssigkeitschromatographie 100

4.1. HPLC der Sesquiterpenlactone 101

4.2. HPLC der Thymolderivate 103

IV. Herkunft, Trocknung und Lagerung des Untersuchungsmaterials 103

1. A. chamissonis Less. ssp. genuina Maguire 103

2. A. sachalinensis (Regl.) A. Gray 104

V. Aufarbeitung der Blüten von A. chamissonis 104

1. Gewinnung der Sesquiterpenlacton-fraktion 104

2. Säulenchromatographische Auftrennung der S1 - Fraktion II 105

3. Acetylierung der Teilfraktionen VII und VIII 106

4. 2-Desacetyl-6-desoxychamissonolid (= Neopulchellin) 108

		Seite
5.	Gewinnung von 2-Desacetyl-6-desoxychamissonolid durch alkalische Hydrolyse von 6-Desoxychamissonolid	109
6.	2-Desacetylchamissonolid	109
7.	Gewinnung von 2-Desacetylchamissonolid durch alkalische Hydrolyse von Chamissonolid	110
8.	Chamissonolid	111
9.	4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid	111
10.	11,13-Dihydrohelenalin	112
VI.	Aufarbeitung der Blüten von A. sachalinensis	113
1.	Extraktion	113
2.	Säulenchromatographische Auftrennung des Extraktes	113
3.	Substanz C (6-Acetyl-2,2-dimethyl-2H-chromen = Desmethoxy-encecalin)	115
4.	Darstellung des 2,4-Dinitrophenylhydrazon - Derivates der Substanz C	116
5.	Thymol (Substanz B)	117
6.	Thymolisobutyrat (Substanz A)	118
7.	Alkalische Hydrolyse von Thymolisobutyrat	118
8.	Substanz D (10-Acetoxy-8,9-epoxythymol-isobutyrat)	119
9.	Substanz F (10-Acetoxy-8-hydroxy-9-isobutyryloxy-thymol)	120

Seite

10. Substanz E 121

11. Acetylierung der Substanz E 122

VII. Die ätherische Ölanalyse 124

G. Literaturverzeichnis 126

A. Einleitung und Problemstellung

Aus der Asteraceen - Gattung Arnica finden die Blütenkörbchen der in Europa heimischen Arnica montana L. als Externum und Internum seit dem 16. Jahrhundert eine verbreitete volksmedizinische und später auch schulmedizinische Verwendung. Auch heute noch gehören ihre Blüten zu den wenigen pflanzlichen Drogen, die im DAB 8 aufgenommen sind und in vielen weiteren Pharmakopoeen geführt werden. Engpässe in der Drogenversorgung und erfolgloser feldmäßiger Anbau führten schon in früheren Zeiten zur Suche nach gleichwertigen Austauschdrogen (ESDORN, 1940; HEEGER, 1956; SEIDEL u. KATING, 1967). In der Volksmedizin wurden mit gleichem Rang A. alpina L., A. acaulis Walt., A. foliosa Nutt. und A. chamissonis Less. verwendet (DRAGENDORFF, 1898; TSCHIRCH, 1917). Während des zweiten Weltkrieges wurden in den USA neben A. montana L. A. sororia Greene, A. fulgens Pursh. und A. cordifolia Hook. in die National Formulary VIII (1946) aufgenommen (YOUNGKEN u. WIRTH, 1945; WOODWARD, 1947). Im 2. AB - DDR und in der Ph. UDSSR IX (1961) ist A. chamissonis Less. neben A. montana L. als gleichwertige Stammpflanze für die "Flores Arnicae" zugelassen, die schon von BRUNZELL u. WESTER (1947) aufgrund ihrer leichten Kultivierbarkeit als Austauschdroge vorgeschlagen wurde. Die Aufmerksamkeit wird somit zwangsläufig auf die gesamte Gattung Arnica gelenkt, deren 32 Arten über die gesamte nördliche Halbkugel verbreitet sind, 27 davon in Nordamerika. MAGUIRE (1943) unterteilt das Genus nach anatomisch-morphologischen Kriterien in fünf Subgenera: Arctica, Austro-

montana, Chamissonis, Montana und Andropurpurea.
Arnica chamissonis Less., die nordamerikanische Wiesenarnika, (Subgenus Chamissonis) ist die am weitesten verbreitete Arnica - Art. Innerhalb ihres großen Areals von Alaska bis New Mexico erfährt sie eine beträchtliche, jedoch fließende Polymorphie, die zu taxonomischen Schwierigkeiten führt. MAGUIRE (1943) beschreibt die drei Unterarten A. chamissonis Less. ssp. genuina Maguire mit den Varietäten typica und interior, A. chamissonis Less. ssp. foliosa (Nutt.) Maguire (= A. foliosa Nutt.) und A. chamissonis Less. ssp. incana (A. Gray) Maguire. HULTÉN (1968) hat die Unterart incana eingezogen und ihr den Rang einer Varietät von der Subspecies foliosa zugewiesen. Die derzeit gebräuchliche Nomenklatur (HULTÉN, 1968) unterscheidet somit nur zwei Unterarten: A. chamissonis Less. ssp. chamissonis Maguire und A. chamissonis Less. ssp. foliosa (Nutt.) Maguire.
Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte A. chamissonis Less. ssp. genuina Maguire (= ssp. chamissonis Maguire) hat ihre natürliche Verbreitung an den Küsten Alaskas und Kanadas. In der Kultur erreicht sie eine Wuchshöhe von 60 - 80 cm. Sie wurde in unserem Arbeitskreis bereits von PRETZSCH (1982) analysiert und in ihrem Habitus beschrieben (s. auch MAGUIRE, 1943; BRUNZELL u. WESTER, 1947; KATING u. Mitarb., 1973).
Arnica sachalinensis (Regl.) A. Gray, die zweite zur Analyse herangezogene Arnica - Art gehört zum Subgenus Andropurpurea. Bei dieser handelt es sich um eine endemische Art,

die nur auf der Insel Sachalin und vereinzelt an der benachbarten asiatischen Küste vorkommt (MAGUIRE, 1943). Ihre hellbraunen, unverzweigten Rhizome werden bis zu 80 cm lang und sind wie bei A. chamissonis bis auf kleine braune 4 mm lange Schuppen kahl. Die groben, 4 - 6 mm starken, unbehaarten grünen Stengel werden in der Kultur 30 - 80 cm hoch, tragen 12 - 20 kräftige unbehaarte Blattpaare und sind meist oberhalb der Mitte verzweigt. Die Blütenkörbchen haben einen Durchmesser von ca. 6 cm. Entsprechend der Zugehörigkeit zum Subgenus Andropurpurea sind die Antheren der Röhrenblüten rot gefärbt. Die Blütezeit liegt zwischen August und Oktober (MAGUIRE, 1943; WILLUHN, 1972a).

Abbildung 1: Arnica sachalinensis (Regl.) A. Gray in Kultur

Als Inhaltsstoffe der Blüten von A. chamissonis Less. und A. sachalinensis wurden bisher Flavonoide (LUCKNER u. Mitarb., 1965; BORKOWSKI u. Mitarb., 1966), Polyacetylene (SCHULTE u. Mitarb., 1969) sowie Kaffeesäure, Chlorogensäure und Cynarin (KOWALEWSKI u. Mitarb., 1969) identifiziert. Über den Gehalt an ätherischem Öl und dessen Zusammensetzung ist von GONTZEL u. Mitarb. (1967), RINN (1970), KATING u. Mitarb. (1973) sowie WILLUHN (1972a,b,c) berichtet worden. Als charakteristische Komponenten treten hier Thymol und verschiedene Thymolderivate auf. Die genannten Komponenten kommen auch in den Blüten von A. montana vor und werden dort mit dem breiten Wirkungsspektrum der Droge in Verbindung gebracht (LABADIE, 1968; DUQUENOIS, 1971; WILLUHN, 1973, 1975), ohne jedoch die bekannten Wirkungen der Droge damit erklären zu können. Eine Wende hierbei trat erst durch die in den letzten Jahren in der Gattung Arnica gefundenen Sesquiterpenlactone ein, bei denen es sich nicht nur um charakteristische und für die Chemotaxonomie wertvolle Sekundärstoffe der Asteraceen handelt (HEROUT, 1966; 1971; HERZ, 1968, 1971; HEROUT u. SORM, 1969), sondern unter denen sich auch zahlreiche Vertreter mit vielfältigen biologischen und pharmakologischen Wirkungen befinden (RODRIGUEZ u. Mitarb., 1971). Die erste in der Gattung Arnica identifizierte Verbindung dieser Stoffklasse war das Pseudoguaianolid Arnifolin, das von EVSTRATOVA u. Mitarb. (1969) aus den Blüten von A. foliosa (= A. chamissonis ssp. foliosa) isoliert wurde (s. Abb. 2 und Tab. 1). In der Folgezeit wurden Sesquiterpenlactone auch in anderen Arnica - Arten identifiziert,

worüber Tab. 1 Auskunft gibt. Wie daraus hervorgeht, gehören die bisher aus der Gattung isolierten Sesquiterpenlactone zur Untergruppe der Pseudoguaianolide, Xanthanolide und Eudesmanolide, deren Grundstrukturen in Abb. 2 wiedergegeben sind. Eine Übersicht über die Chemie, die Biogenese, das Vorkommen und die chemotaxonomische Bedeutung der Sesquiterpenlactone geben SORM u. DOLJES (1965), STELLINK u. SPITZNER (1966), HEROUT (1966, 1971), HERZ (1968, 1971), HEROUT u. SORM (1969), GEISSMAN (1973), YOSHIOKA u. Mitarb. (1973), FISCHER u. Mitarb. (1976), MABRY u. BOHLMANN (1977) sowie FISCHER u. Mitarb. (1979).

Helenalin und 11,13-Dihydrohelenalin sowie deren Ester müssen nach neueren Untersuchungen als die wesentlichen Wirkstoffe und als das bisher unbekannte toxische Prinzip der Blüten von A. montana angesehen werden (WILLUHN, 1981; RÖTTGER, 1981; WITZEL u. Mitarb. 1976; KIM, 1980). Sie wirken cytotoxisch, antitumoral und antibiotisch (u.a. LEE u. Mitarb., 1972, 1977a, 1977b; HLADON u. Mitarb., 1975; HALL u. Mitarb., 1977; OLECHNOWICZ u. STEPIEN, 1963; WILLUHN u. Mitarb., 1982); sie haben eine starke atemanaleptische Wirkung und sind herz- und kreislaufwirksam (LAMSON, 1913; LIST u. FRIEBEL, 1974; RÖTTGER, 1981; WILLUHN u. RÖTTGER, 1982); sie entfalten eine starke antiphlogistische und antihyperlipidämische Wirkung (HALL u. Mitarb., 1979, 1980a, 1980b). Auch für die bei äußerlicher Anwendung von Arnica - Präparaten gelegentlich auftretenden allergenen Kontaktdermatiden sind sie verantwortlich zu machen (HERRMANN u. Mitarb., 1978; HAUSEN u. Mitarb., 1978; HAUSEN, 1980).

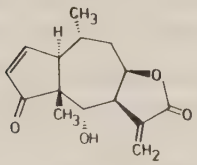
Tabelle 1 : Bisher aus der Gattung Arnica isolierte Sesquiterpenlactone (Sl); (H = Helenalin, DH = 11,13-Dihydrohelenalin, TH = Tetrahydrohelenalin)

Art u. Organ	Sl	Literatur
A. montana Blatt	DH, TH, DH-acetat DH-isovalerianat, DH-isobutyrat, DH-α-methacrylat	POPLAWSKI u. Mitarb. 1971
	DH-tiglinat	RÖTTGER 1981
Blüte	H-, DH-acetat	LIST u. FRIEBEL 1974 RÖTTGER 1981
	H-α-methacrylat	HERRMANN u. Mitarb. 1978 RÖTTGER 1981
	H, DH	RÖTTGER 1981
	DH-α-methacrylat	RÖTTGER u. WILLUHN 1980
	H-, DH-isovalerianat	
	H-, DH-tiglinat	
	H-, DH-, TH-isobutyrat	WILLUHN u. RÖTTGER 1981
	2β-Ethoxy-2,3-DH-isobutyrat	
A. longifolia Blüte	H, Carabron	WILLUHN u. HERRMANN 1976
	H-, DH-acetat	WILLUHN u. HERRMANN 1979
	Xanthalongin	
A. chamissonis ssp. genuina Blüte	Chamissonolid	WILLUHN u. Mitarb. 1981
	6-Desoxychamissonolid	
	H, H-tiglinat	PRETZSCH 1982
	Ivalin	WILLUHN u. KRESKEN 1981
Blatt	Chamissonolid	PRETZSCH 1982
	6-Desoxychamissonolid	

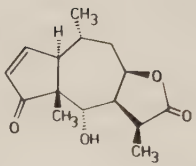
Art u. Organ	Sl	Literatur
A. chamissonis ssp. foliosa Blüte	Arnifolin	EVSTRATOVA u. Mitarb. 1969 KRESKEN u. WILLUHN 1982
	Carabron*	HOLUB u. Mitarb. 1972
	Chamissonolid 6-Desoxychamissonolid DH-isobutyrat H-2-methylbutyrat H-, DH-isovalerianat 2α-OH-TH-senecionat 4,6-Di-O-acetyl-chamissonolid	WILLUHN u. KRESKEN 1981 KRESKEN u. WILLUHN 1982 KRESKEN (laufende Diss.)
	DH-propionat 4-O-Acetyl-6-desoxy-chamissonolid	WILLUHN u. Mitarb., im Druck
A. chamissonis ssp. incana Blüte	Chamissonolid 6-Desoxychamissonolid 4-Acetyl-6-desoxy-chamissonolid DH, DH-acetat DH-isovalerianat DH-isobutyrat H-, DH-tiglinat DH-propionat 4,6-Di-O-acetyl-chamissonolid Arnifolin 2α-OH-TH-senecionat	WILLUHN u. KRESKEN 1981 KRESKEN u. WILLUHN 1982 KRESKEN (laufende Diss.)
A. viscosa Kraut	H, DH DH-acetat	WILLUHN u. EBERT, in Vorbereitung

*Carabron ist das Haupt - Sl von A. longifolia und konnte von WILLUHN u. KRESKEN (1981) in mehreren Herkünften von A. chamissonis ssp. foliosa nicht nachgewiesen werden. Wahrscheinlich ist von HOLUB u. Mitarb. (1972) A. longifolia untersucht worden, die häufiger mit A. chamissonis ssp. foliosa verwechselt wird (s. KATING u. Mitarb., 1971).

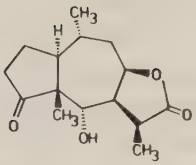
Pseudoguaianolide:



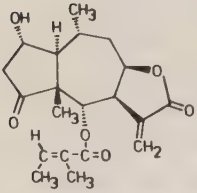
Helenalin



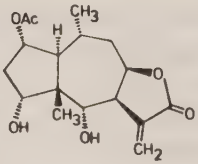
11,13-Dihydrohelenalin



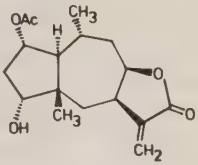
Tetrahydrohelenalin



Arnifolin

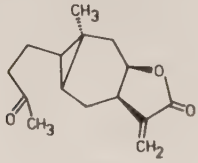


Chamissonolid

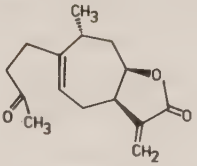


6-Desoxychamissonolid

Xanthanolide:

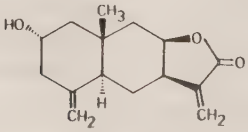


Carabron



Xanthalongin

Eudesmanolid:



Ivalin

Abbildung 2: Bisher in Arnica - Arten gefundene Sesquiterpenlactone. Helenalin, 11,13-Dihydro- und Tetrahydrohelenalin liegen auch mit verschiedenen Säuren verestert vor. Die freien Hydroxylgruppen von Chamissonolid und 6-Desoxychamissonolid können ebenfalls mit Essigsäure verestert sein.

Vor diesem Hintergrund wurden auch die Wirkungen des aus A. chamissonis isolierten Hauptsesquiterpenlactons Chamissonolid untersucht (PRETZSCH, 1982). Es wirkt wie Helenalin allergen und atemanaleptisch. Die antiphlogistische Wirkung entspricht derjenigen von 11,13-Dihydrohelenalin bzw. Phenylbutazon. Antibiotische Eigenschaften konnten bis zu einer Konzentration von 100 µg / Filterrondelle im Plattendiffusionstest jedoch nicht festgestellt werden. Auch die Herzwirksamkeit zeigte am isolierten Papillarmuskel des Meerschweinchens einen von Helenalin abweichenden Wirkungsverlauf.

Während in den Blüten von A. montana neben den veresterten Sesquiterpenlactonen auch die entsprechenden freien Verbindungen gefunden wurden, sind aus den Blüten von A. chamissonis bisher nur veresterte bzw. partialveresterte Pseudoguaianolide isoliert worden. Vermutlich wurden die nicht veresterten Vorstufen aufgrund des lipophilen Extraktionsverfahrens nicht miterfaßt. Ein Ziel der vorliegenden Untersuchung ist deshalb der Nachweis und die Isolierung sowie Identifizierung der Desacetylverbindungen von Chamissonolid und 6-Desoxychamissonolid. Bei der ersten Verbindung würde es sich um einen neuen Naturstoff handeln, während die zweite Verbindung mit dem aus Gaillardia pulchella Foug. bereits isolierten Neopulchellin identisch wäre (YANAGITA u. Mitarb., 1970a,b; WILLUHN u. Mitarb., im Druck).

Zum anderen soll mit A. sachalinensis die erste Arnica - Art aus dem Subgenus Andropurpurea auf ihre Sesquiterpenlactonführung untersucht werden. Sie fällt unter den bisher

untersuchten Arnica - Arten durch einen besonders hohen Gehalt an ätherischem Öl in ihren Blütenkörbchen auf (WILLUHN, 1972a). Die chemische Analyse der Blüten dieser Art ist darüber hinaus noch sehr unvollständig, so daß hier auch auf die Identifizierung weiterer Inhaltsstoffe Wert gelegt werden soll.

B. Untersuchungen zur Sesquiterpenlactonführung der Blütenkörbchen von Arnica chamissonis Less. ssp. genuina Maguire

I. DC - Analyse und Fraktionierung der Sesquiterpenlactonfraktion

Die beiden dominierenden Sesquiterpenlactone* der Blüten von A. chamissonis ssp. genuina, Chamissonolid und 6-Desoxychamissonolid, wurden von WILLUHN u. Mitarb. (1981) nach Extraktion der Blüten mit Benzol gewonnen. Zur Erfassung der eventuell in der Droge auftretenden hydrophileren Desacetylderivate dieser beiden Verbindungen wurde die Droge mit Ethanol im Soxhletverfahren erschöpfend extrahiert. Die mitextrahierten Gerbstoffe wurden mit Bleiacetat gefällt und die Lösung nach Filtration und Zugabe von Wasser intensiv mit Chloroform ausgeschüttelt (s. Exp. Teil, S. 104). Zur Reinigung des dunkelbraunen, zähflüssigen Rückstandes der Chloroformausschüttelung (18,53 g) wurde dieser mit einem Petrolether/Benzol/Chloroform/Methanol - Gemisch über eine Säule mit 1,2 kg Aluminiumoxid filtriert und mit einem Chloroform/Methanol - Gemisch

---

* Im folgenden wird für Sesquiterpenlactone die Abkürzung Sl, für dünnschichtchromatographisch und Dünnschichtchromatographie dc bzw. DC, für säulenchromatographisch und Säulenchromatographie sc bzw. SC, für gaschromatographisch und Gaschromatographie gc bzw. GC und für Retentionszeit die Abkürzung RT verwendet.

nachgewaschen (HERRMANN, 1978). Hierbei wurde eine Fraktion erhalten, in der dc durch Co - Chromatographie von Vergleichssubstanzen neben den bereits in den Blüten gefundenen Sl Chamissonolid, 6-Desoxychamissonolid, Helenalin und Helenalintiglinat noch 4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid (hR_f 95) und 11,13-Dihydrohelenalin (hR_f 62) nachgewiesen werden konnten (s. Abb. 3). Im unteren Bereich des Chromatogramms trat darüber hinaus eine im UV - Licht (254 nm) schwach fluoreszierende Zone auf, die sich mit Hydroxylamin/$FeCl_3$ schwach braun färbte. Mit Anisaldehyd/H_2SO_4 ergab der obere Teil dieser Zone (hR_f 26) ein kräftig blauviolett gefärbtes und der untere (hR_f 24) ein braun gefärbtes Reaktionsprodukt. Diese Färbung entsprach derjenigen von 6-Desoxychamissonolid bzw. Chamissonolid. Dies und die Lage im Chromatogramm ließ vermuten, daß es sich hier um die gesuchten Desacetylverbindungen dieser beiden Sl handelte.

Zur Isolierung dieser beiden Verbindungen sowie der dc mit 4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid und 11,13-Dihydrohelenalin identischen Substanzen wurde die Sl - Fraktion (0,91 g) an Kieselgel mit Ether sc aufgetrennt. Hierbei wurden 8 Teilfraktionen erhalten (s. Exp. Teil, S. 105). Vor dem nächsten Reinigungsschritt wurde zunächst geklärt, ob es sich bei den nach der SC in den Teilfraktionen VII und VIII anfallenden beiden Verbindungen wie vermutet um die Desacetylverbindungen von 6-Desoxychamissonolid und Chamissonolid handeln könnte. Hierzu wurden jeweils ca. 3 mg dieser Teilfraktionen mit Acetanhydrid/Pyridin acetyliert und anschließend

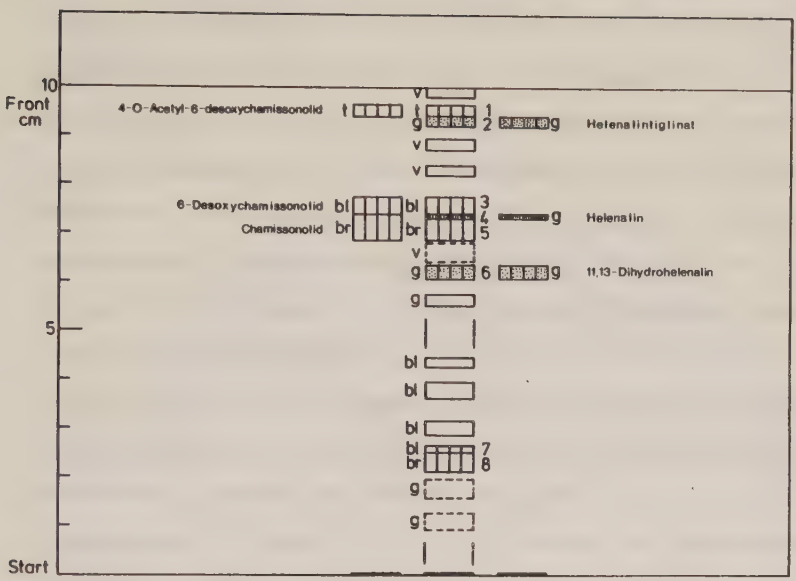


Abbildung 3: DC des S1 - Extraktes aus den Blüten von A. chamissonis ssp. genuina

Schicht: Kieselgel 60 F_{254} ; Fließmittel: Ethylacetat (100)

Detektion: UV bei 254 nm ▭ bzw. | | (schwach)

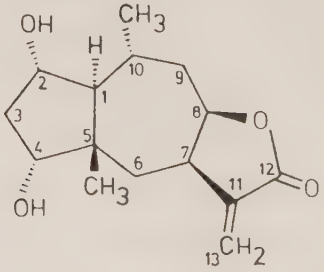
Hydroxylamin/$FeCl_3$ ▭ ZIMMERMANN - Reagenz ▭

Anisaldehyd/H_2SO_4 bl = blau-violett; br = braun;
g = gelb; t = türkis-blau;
v = violett

einer DC-, GC- und GC/MS - Analyse zugeführt. Im DC (System 5) traten hiernach in Höhe von mitchromatographiertem 4,6-Di-O-acetylchamissonolid (hR_f 64) und 4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid (hR_f 80) Flecke auf, die sich beim Detektieren mit Hydroxylamin/$FeCl_3$ und Anisaldehyd/H_2SO_4 wie diese braun bzw. blau und braun bzw. türkis-blau färbten. Im GC traten Komponenten auf, die nach Zuspritzen der genannten Vergleichssubstanzen mit diesen übereinstimmten. Die durch GC/MS - Analyse erhaltenen Massenspektren der beiden Verbindungen waren mit denen von 4,6-Di-O-acetylchamissonolid und 4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid identisch. Damit war nachgewiesen, daß die Blüten der Unterart genuina von A. chamissonis auch die freien Alkohole von Chamissonolid und 6-Desoxychamissonolid führen. Zur weiteren spektroskopischen Identifizierung wurden diese aus den Teilfraktionen VII und VIII isoliert.

II. Isolierung und Identifizierung der Sesquiterpenlactone

1. Isolierung und Identifizierung von 2-Desacetyl-6-desoxychamissonolid (= Neopulchellin)



2-Desacetyl-6-desoxychamissonolid (= Neopulchellin)

Die Teilfraktion VII (51,78 mg) wurde an 15 g Aluminiumoxid sc mit Ethylacetat aufgetrennt (s. Exp. Teil, S. 108). Hierbei wurde die hydroxamat - positive Komponente dc einheitlich aufgefangen (16,1 mg). Das GC (System 1) zeigte, daß es sich hierbei um ein Substanzgemisch mit zwei Hauptkomponenten handelte (RT 5,3 und 6,2 Min.). Durch präparative HPLC in System I wurden 1,2 mg der Komponente mit RT 5,3 Min. als gc einheitliche, farblose Kristalle erhalten (HPLC Peak 2 : RT 44,4 Min., s. Abb. 43, S. 102). Nach Laufhöhe (hR_f 26) und Anfärbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4 sowie der gc Retentionszeit (RT 5,3 Min.) handelte es sich um Substanz 7 des abgebildeten Chromatogramms der S1 - Gesamtfraktion (s. Abb. 3, S. 13), die nach Acetylierung mit 4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid identisch war.
Die Substanz schmolz bei 164 - 166°C (Neopulchellin: 166,5 - 167,5°C, YANAGITA u. Mitarb., 1970a,b). Das UV - Spektrum zeigt wie Neopulchellin ein Maximum bei λ_{max} 213 nm (YANAGITA u. Mitarb., 1970b) und weist auf eine Exomethylengruppe in α,β - Stellung zur Ketogruppe des Lactonringes hin (DEUEL u. GEISSMAN, 1957).
Das Massenspektrum (Abb. 4) zeigt den Molekülpeak bei M^+ = 266. Die Folgefragmente bei m/z 248 und 230 deuten auf die Abspaltung von ein bzw. zwei Wassermolekülen hin (M^+ - 18 bzw. M^+ - 2x18). Danach sollte die Verbindung zwei freie Hydroxylgruppen besitzen. Den Basispeak bildet ein Fragment mit der Masse m/z 94.

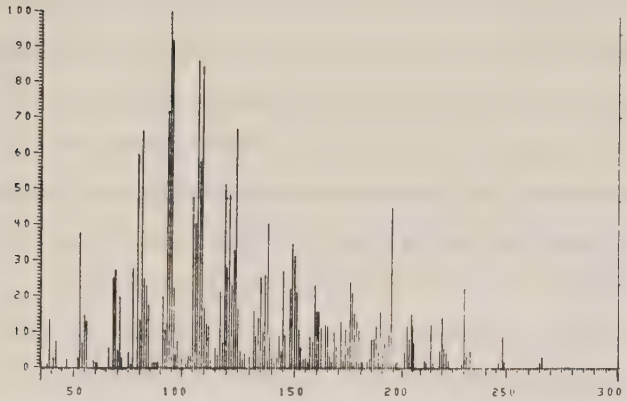


Abbildung 4: Massenspektrum von 2-Desacetyl-6-desoxy-chamissonolid

Zur Bestätigung, daß es sich bei dieser Verbindung um das Desacetylderivat von 6-Desoxychamissonolid (= Neopulchellin) handelt, wurden ^{1}H-NMR - spektroskopische Messungen an einem 360 MHz - Gerät durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten des ^{1}H-NMR - Spektrums (s. Abb. 5) sind in Tabelle 2 bzw. Tabelle 3 aufgeführt und den Angaben von 6-Desoxychamissonolid (WILLUHN u. Mitarb., 1981) sowie den nur unvollständig vorliegenden Angaben für Neopulchellin (YANAGITA u. Mitarb., 1970b) gegenübergestellt.

Als signifikante Signale erscheinen die tertiäre Methylgruppe an C-5 als Singulett bei 0,824 ppm und die sekundäre Methylgruppe an C-10 als Dublett bei 1,266 ppm. Die Protonen der Exomethylengruppe am γ - Lactonring geben sich als zwei Dubletts bei 6,266 bzw. 5,650 ppm zu erkennen. Die chemischen Verschiebungen, Aufspaltungsmuster und Kopplungs-

konstanten der Protonen des Heptanringes entsprechen denen von 6-Desoxychamissonolid. Anders als bei dieser Verbindung kann hier das Signal für das Proton H-6a(α) als Doppeldublett bei 2,130 ppm mit den Kopplungskonstanten J = 14,5 und 4,0 Hz eindeutig lokalisiert werden. Durch Einstrahlung auf die Resonanzfrequenz von H-8 vereinfacht sich das Signal bei 1,854 ppm (H-9b(α)) zu einem verbreiterten Dublett, resultierend aus der geminalen Kopplung zu H-9a(β) (J = 13,6 Hz) und der vicinalen Kopplung zu H-10 (J = ~ 1 Hz). Die Lage der Protonen H-9a(β) und H-10 wurde durch Einstrahlungsversuche auf die Signale von H-8, H-9b(α) und die Methylgruppe an C-10 im Bereich von 1,95 bis 2,10 ppm lokalisiert.

Das Signal für das Proton an C-2 ist im Vergleich zu 2-Desoxychamissonolid wegen der fehlenden Acetatgruppe erwartungsgemäß ins höhere Feld verschoben (4,070 gegenüber 4,875 ppm). Das komplexere Aufspaltungsmuster ist durch die zusätzliche Kopplung mit dem Hydroxylproton zu erklären. Auch die Protonen an C-1 und C-3 erscheinen im etwas höheren Feld als bei der an C-2 acetylierten Verbindung. Durch Einstrahlungsversuche wurden das Doppeldublett bei 1,778 ppm dem Proton an C-1 und die Signale bei 2,675 und 1,550 ppm den Protonen H-3a(β) und H-3b(α) zugeordnet. Das Signal des Protons an C-4 erscheint wie bei 2-Desoxychamissonolid und Neopulchellin als Dublett bei 3,708 ppm, das aus der Kopplung mit nur einem Proton an C-3, nämlich H-3a(β) resultiert (J = 5 Hz). Dieses Aufspaltungsmuster als Dublett ergibt sich aus der β - Orientierung von H-4, das, wie auch

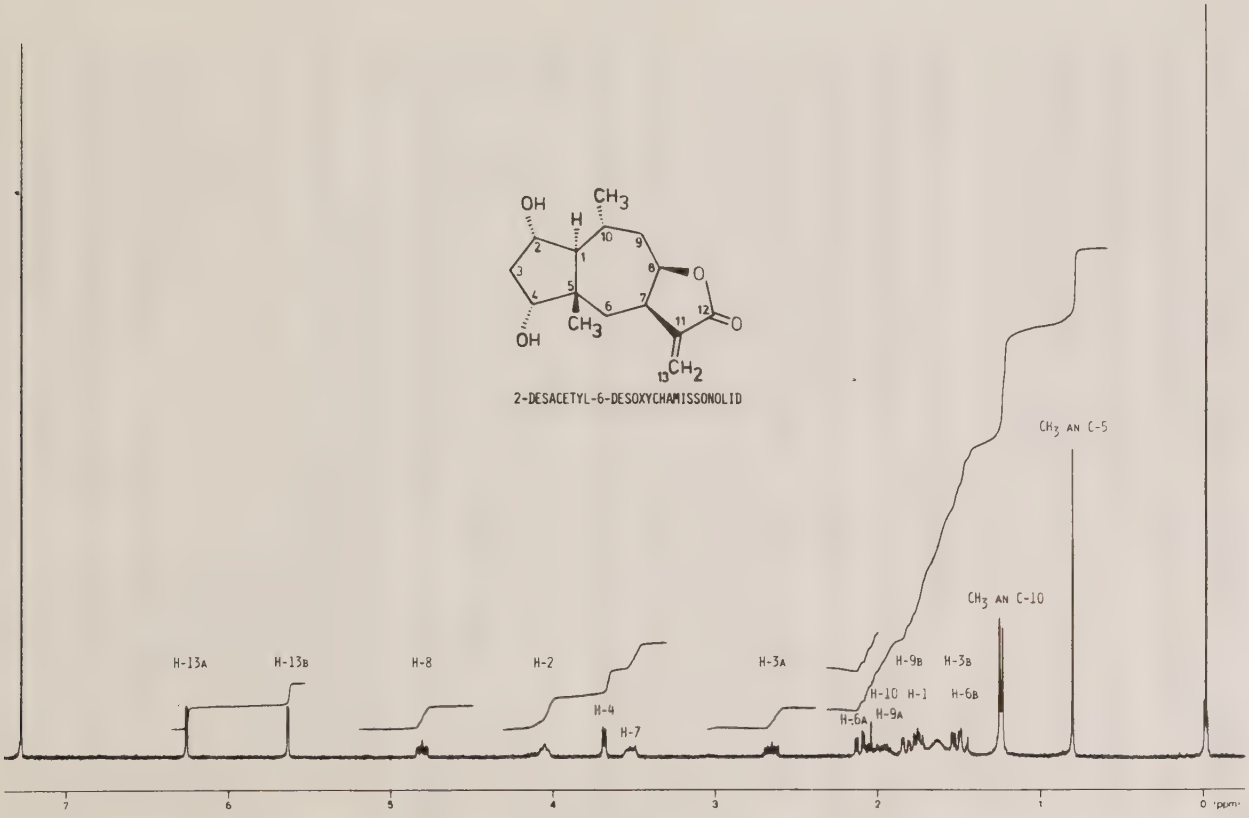


Abbildung 5: ^{1}H-NMR - Spektrum von 2-Desacetyl-6-desoxychamissonolid

Tabelle 2: ^{1}H-NMR - Verschiebungen δ (ppm, rel. zu TMS = 0) und Multiplizitäten von 2-Desacetyl-6-desoxychamissonolid (Neopulchellin) in $CDCl_3$

s: Singulett; d: Dublett; m: Multiplett; c: complex

Protonen	2-Desacetyl-6-desoxy-chamissonolid	Neopulchellin[1)]	6-Desoxy-chamissonolid[2)]
1	1,775 dd	-	2,158 dd
2	4,070 m	4,00 c	4,875 ddd
3a (β)	2,675 ddd	-	2,763 ddd
3b (α)	1,550 dd	-	1,500 dd
4	3,708 d	3,68 d	3,726 d
6a (α)	2,130 dd	-	1,95 - 2,17
6b (β)	1,516 dd	-	1,546 dd
7	3,550 m	-	3,558 m
8	4,825 ddd	4,70 c	4,816 ddd
9a (β)	1,95 - 2,10	-	1,95 - 2,17
9b (α)	1,854 dd	-	1,841 dd (br)
10	1,95 - 2,10	-	1,925 m
13a	6,266 d	6,23 d	6,275 d
13b	5,650 d	5,66 d	5,665 d
CH_3 an C-5	0,824 s	0,81 s	0,858 s
CH_3 an C-10	1,266 d	1,25 d	1,100 d
OH an C-4	1,650 s (br)	-	1,645 s (br)

1) YANAGITA u. Mitarb. (1970b); 2) WILLUHN u. Mitarb. (1981)

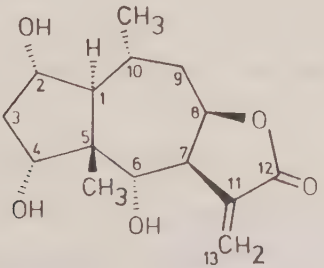
Tabelle 3: Kopplungskonstanten J (Hz) von 2-Desacetyl-6-desoxychamissonolid (Neopulchellin) in $CDCl_3$

J	2-Desacetyl-6-desoxy-chamissonolid	Neopulchellin[1)]	6-Desoxy-chamissonolid[2)]
1,2	7,4	-	8,2
1,10	11,5	-	-
2,3a	9,2	-	9,2
2,3b	2,9	-	3,0
3a,3b	(-) 15,6	-	(-) 16,0
3a,4	5,0	5	5,1
6a,6b	(-) 14,5	-	(-) 14,5
6a,7	4,0	-	-
6b,7	13,0	-	13,2
7,8	8,0	-	8,0
7,13a	2,3	3	2,2
7,13b	2,1	3	2,2
8,9a	11,5	-	8,8
8,9b	3,4	-	3,5
9b,9a	(-) 13,6	-	-
9b,10	1	-	-
10,-CH_3	6,8	5	6,8
13a,13b	-	-	0,5

1) YANAGITA u. Mitarb. (1970b); 2) WILLUHN u. Mitarb. (1981)

das Dreiding - Modell zeigt, mit dem Proton H-3b(α) einen rechten Diederwinkel bildet und somit mit diesem eine annähernde Nullkopplung aufweist. Gleichzeitig geht daraus hervor, daß sich H-4 in cis - Position zur Methylgruppe an C-5 befindet (SAMEK, 1970), die bereits aus biogenetischen Gründen als β - ständig anzusehen ist.
Nach diesen Untersuchungen kommt der isolierten Verbindung die auf S. 14 wiedergegebene Struktur zu. Es handelt sich um das 2-Desacetylderivat von 6-Desoxychamissonolid und ist identisch mit dem aus Gaillardia pulchella Foug. isolierten Neopulchellin, dessen ^{1}H-NMR - Daten hier erstmals vollständig ermittelt wurden.
Die chemischen Verschiebungen, Aufspaltungsmuster und Kopplungskonstanten der Signale belegen die gleiche Konfiguration wie sie für 6-Desoxychamissonolid nachgewiesen wurde, dessen Hydrolyseprodukt nach DC-, GC- und GC/MS - Analyse identisch war mit der isolierten Verbindung.

2. Isolierung und Identifizierung von 2-Desacetylchamissonolid



2-Desacetylchamissonolid

Bei der Isolierung von 2-Desacetyl-6-desoxychamissonolid aus Teilfraktion VII (s. Exp. Teil, S. 108) durch präparative HPLC in System I fiel ein zweites S1 an (HPLC Peak 1 : RT 18,8 Min., s. Abb. 43, S. 102). Die auch aus Teilfraktion VIII isolierte farblose Verbindung war gc nicht vollständig rein. Nach Laufhöhe (hR_f 24, DC - System 4) und Retentionszeit (RT 6,2 Min., System 1) handelte es sich um Substanz 8 des abgebildeten Chromatogramms der S1 - Gesamtfraktion (s. Abb. 3, S. 13), die nach Acetylierung der Teilfraktionen VII und VIII aufgrund der DC-, GC- und GC/MS - Analysen mit 4,6-Di-O-acetylchamissonolid identisch war, so daß es sich bei ihr um 2-Desacetylchamissonolid handeln sollte.

Die Substanz zeigt ein UV - Absorptionsmaximum bei λ_{max} 216 nm, dessen Lage auch hier auf eine Exomethylengruppe in α,β - Stellung zur Ketogruppe am γ - Lactonring hindeutete (DEUEL u. GEISSMAN, 1957). Das Massenspektrum (s. Abb. 6) zeigt den Molekülpeak bei M^+ = 282.

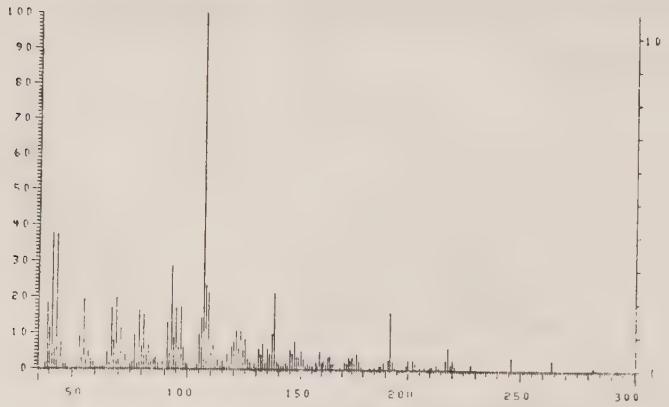


Abbildung 6: Massenspektrum von 2-Desacetylchamissonolid

Die drei folgenden Spaltprodukte bei m/z 264, 246 und 228 (M^+ - 18, M^+ - 36, M^+ - 54) deuten auf die Abspaltung von jeweils einem Molekül Wasser. Die Verbindung sollte deshalb drei freie Hydroxylgruppen besitzen. Basispeak ist wie bei Chamissonolid ein Fragment mit der Masse m/z 107. Das übrige Fragmentierungsmuster ist identisch mit dem von Chamissonolid (s. Exp. Teil, S. 110), so daß es sich auch aufgrund des Massenspektrums bei der isolierten Verbindung um 2-Desacetylchamissonolid handeln sollte.
Auch das ^{1}H-NMR - Spektrum (s. Abb. 7) belegt die Struktur der nicht ganz reinen Verbindung als 2-Desacetylchamissonolid. Die chemischen Verschiebungen, Aufspaltungsmuster und Kopplungskonstanten sind in Tabelle 4 und Tabelle 5 aufgeführt und den Daten von Chamissonolid gegenübergestellt (vgl. auch die Daten für 2-Desacetyl-6-desoxychamissonolid, Tab. 2 und Tab. 3, S. 19 bzw. 20). Im Spektrum erscheinen die beiden charakteristischen Dubletts im Tieffeld (δ = 6,380 und 5,830 ppm) für die Exomethylenprotonen H-13a und H-13b und die Signale für die CH_3 - Gruppen an C-5 und C-10 im Hochfeld (δ = 0,883 bzw. 1,263 ppm) mit den für Pseudoguaianolide zu erwartenden chemischen Verschiebungen und Aufspaltungsmustern. Durch Einstrahlung auf die Frequenz der Exomethylenprotonen kann die Lage von H-7 als Multiplett bei δ = 3,521 ppm ermittelt werden, das bei Pseudoguaianoliden α - orientiert ist. Einstrahlung auf dieses Multiplett vereinfacht umgekehrt die beiden Dubletts der Exomethylenprotonen zu Singuletts. Die unter 3 Hz liegenden allylischen Kopplungen von H-13a/H-7 und H-13b/H-7

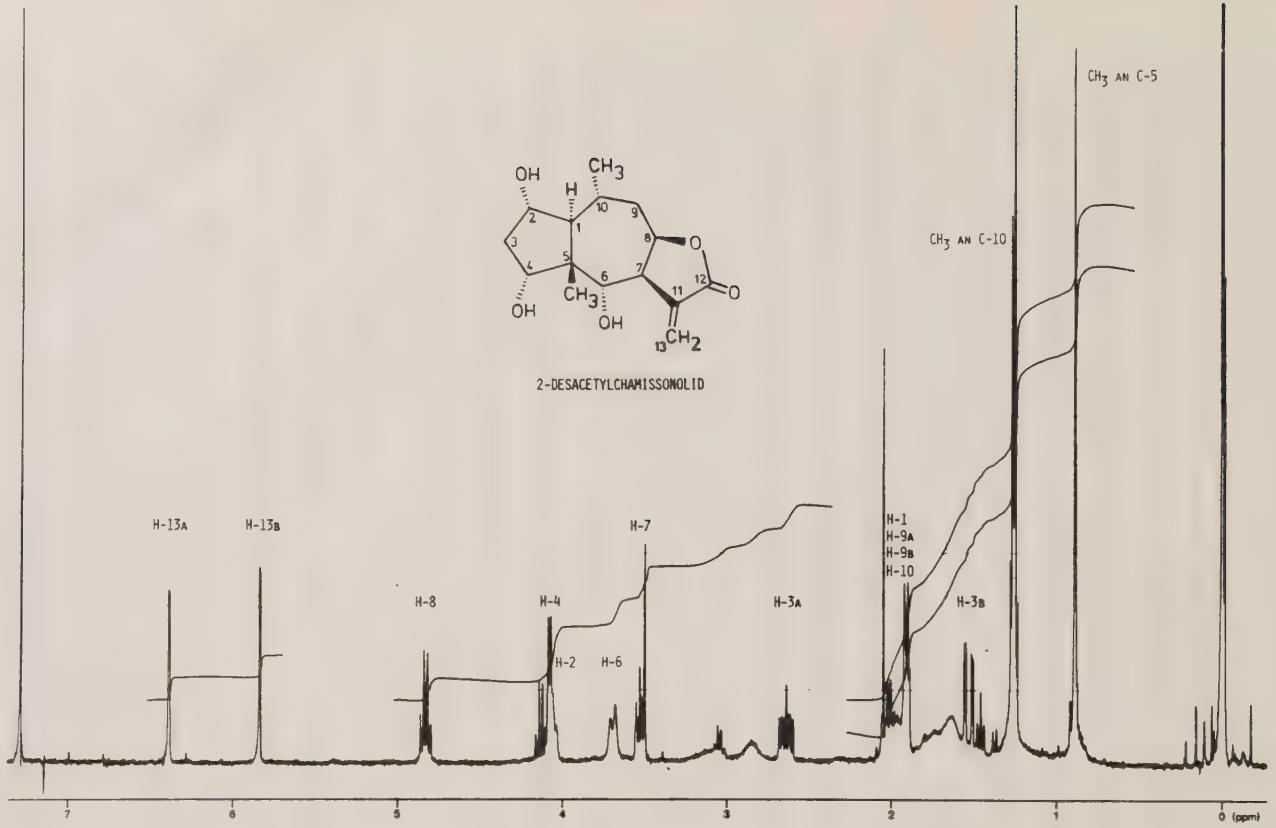


Abbildung 7: ^{1}H-NMR - Spektrum des isolierten 2-Desacetylchamissonolid

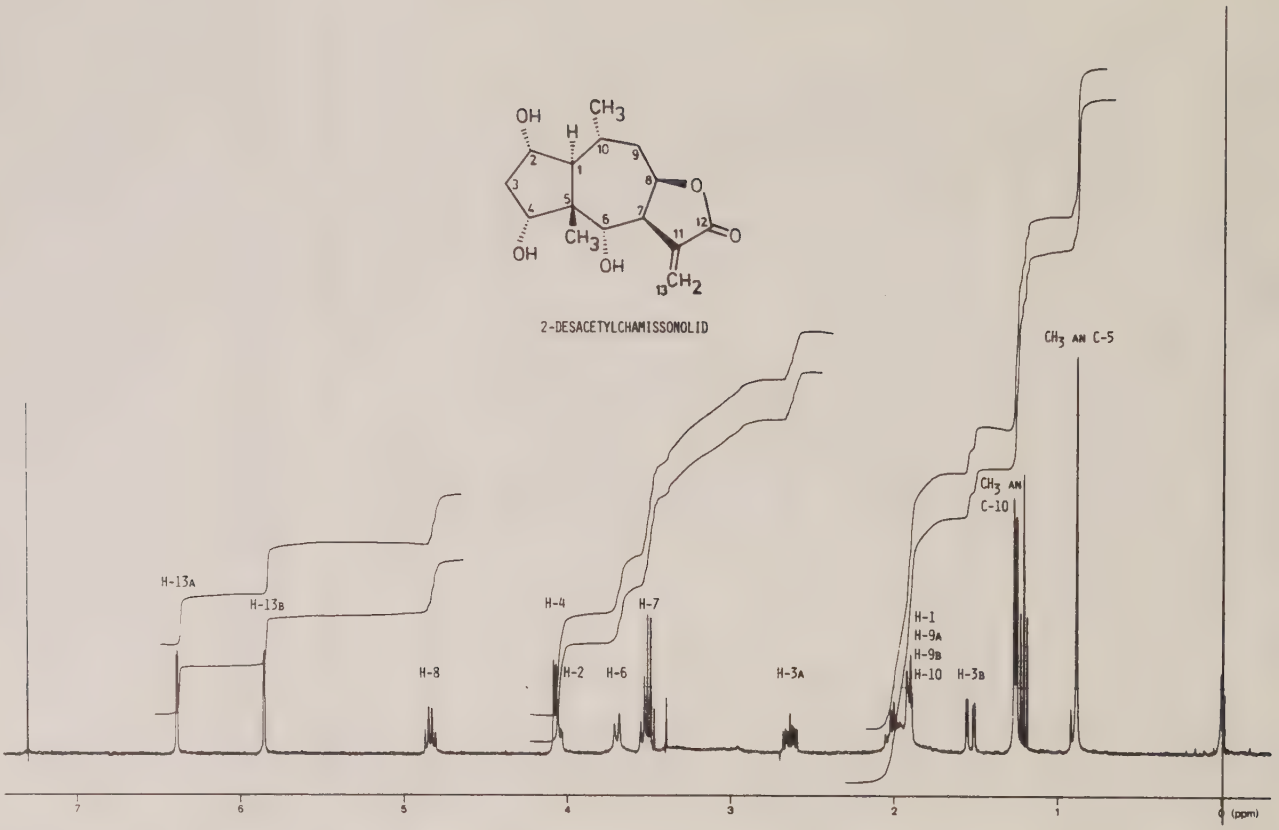


Abbildung 8: ^{1}H-NMR - Spektrum von 2-Desacetylchamissonolid (Hydrolyseprodukt von Chamissonolid)

Tabelle 4: ^{1}H-NMR - Verschiebungen δ (ppm, rel. zu TMS = 0) und Multiplizitäten von 2-Desacetylchamissonolid in $CDCl_3$
s: Singulett; d: Dublett; m: Multiplett

Protonen	2-Desacetylchamissonolid	Chamissonolid*
1	1,89 - 2,06	2,366 dd
2	4,050 m	4,885 ddd
3a (β)	2,632 ddd	2,721 ddd
3b (α)	1,530 dd	1,483 dd
4	4,070 d	4,093 d
6	3,687 d (br)	3,716 d (br)
7	3,521 m	3,548 m
8	4,823 ddd	4,824 ddd
9a	1,89 - 2,06	1,85 - 2,12
9b	1,89 - 2,06	1,85 - 2,12
10	1,89 - 2,06	1,965 m
13a	6,380 d	6,363 d
13b	5,830 d	5,853 d
CH_3 an C-5	0,883 s	0,933 s
CH_3 an C-10	1,263 d	1,100 d

*WILLUHN u. Mitarb. (1981); Multiplizitäten s. PRETZSCH (1982)

Tabelle 5: Kopplungkonstanten J (Hz) von 2-Desacetyl-chamissonolid in $CDCl_3$

J	2-Desacetylchamissonolid	Chamissonolid*
1,2	-	8,2
2,3a	9,3	9,2
2,3b	3,0	3,0
3a,3b	(-) 15,8	(-) 16,0
3a,4	5,8	5,5
6,7	10,0	10,2
7,8	7,8	8,0
7,13a	2,0	2,0
7,13b	1,5	2,0
10,-CH_3	6,3	6,8
13a,13b	-	0,5

*WILLUHN u. Mitarb. (1981)

sprechen nach der Regel von SAMEK (1970, 1978) für eine cis - Verknüpfung des Lactonringes mit dem Heptanring. Bei Einstrahlung auf die Frequenz von H-7 verändert sich gleichzeitig ein bei 3,687 ppm liegendes breites Dublett zu einem breiten Singulett. Aufgrund der chemischen Verschiebung und Multiplizität muß dieses Signal dem Proton an C-6 zugeordnet werden, an dem gleichzeitig eine freie OH - Gruppe lokalisiert ist. Aus der relativ großen Kopplungskonstante von J = 10 Hz für H-6/H-7 ergibt sich eine trans - Stellung der beiden Protonen, d.h. die OH - Gruppe an C-6 ist wie bei

Chamissonolid α - ständig. Eine weitere Vereinfachung des Spektrums bei Einstrahlung auf die Resonanzfrequenz von H-7 tritt bei dem Signal δ = 4,823 ppm auf, das nach chemischer Verschiebung und Aufspaltungsmuster von H-8 hervorgerufen wird. Dieses Vier-Linien-Signal mit einer Intensität von annähernd 1:3:3:1 resultiert aus der Kopplung von H-8 mit H-7 und mit den beiden Protonen an C-9 und ist als Dublett von Dubletts von Dubletts zu interpretieren, bei dem alle drei Kopplungskonstanten annähernd gleich groß sind. Bei Einstrahlung auf die Resonanzfrequenz von H-7 vereinfacht sich die Multiplizität zu einem Drei-Linien-Signal, aus dem sich die Größe der Kopplungskonstanten von H-8/H-9a und H-8/H-9b innerhalb des Bereichs von J = 6,5 - 8,5 Hz ablesen lassen. Die Einstrahlung in den Bereich von 1,89 - 2,06 ppm, in dem aufgrund von Einstrahlungsversuchen neben H-1 und H-10 auch H-9a und H-9b lokalisiert sind, führt zu einer Veränderung des Signals von H-8 zu einem Dublett mit einer Kopplungskonstante für H-7/H-8 von J = 7,8 Hz.

Die Daten für H-6, H-7, H-8, H-9a, H-9b und H-10 stimmen somit mit denen von Chamissonolid überein. Abweichend von Chamissonolid fehlt jedoch im Spektrum erwartungsgemäß bei 4,885 ppm das Signal für das Proton an C-2. Dieses tritt bei der isolierten Verbindung bei 4,050 ppm auf. Aufgrund der fehlenden Acetylgruppe an C-2 ist es hier ins höhere Feld verschoben und fällt fast mit dem als Dublett erscheinenden Signal von H-4 zusammen (δ = 4,070 ppm). Ebenfalls geringfügig ins höhere Feld verschoben sind die

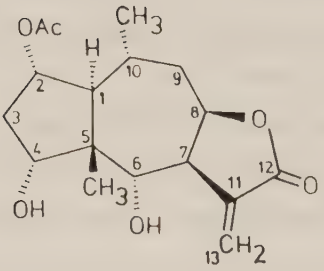
Signale für die Protonen an C-3 (s. Tab. 4, S. 26), die ansonsten dasselbe Aufspaltungsmuster wie Chamissonolid zeigen.

Die ^{1}H-NMR - Daten weisen somit die isolierte Verbindung als 2-Desacetylderivat von Chamissonolid aus. Lediglich die sterische Stellung der Methylgruppe an C-10 läßt sich aus dem ^{1}H-NMR - Spektrum nicht klären, da die Kopplungskonstanten von H-9a/H-10, H-9b/H-10 und H-1/H-10 dem Spektrum nicht entnommen werden können. Aus diesem Grund wurde Chamissonolid hydrolytisch gespalten (s. Exp. Teil, S. 110) und das erhaltene 2-Desacetylderivat durch DC-, GC-, MS- und ^{1}H-NMR - Analyse mit der isolierten Verbindung verglichen. Beide Substanzen zeigen sich hierbei als identisch (vgl. ^{1}H-NMR - Spektren Abb. 7 und Abb. 8, S. 24 bzw. 25). Zusätzlich wurde die Verbindung acetyliert. Das Derivat erweist sich nach DC-, GC- und MS - Analyse als 4,6-Di-O-acetylchamissonolid, das von KRESKEN u. WILLUHN (1982) als natürlich vorkommendes Chamissonolidderivat aus den Blüten der Subspecies foliosa von A. chamissonis isoliert werden konnte.

Die durchgeführten Analysen belegen somit eindeutig die Struktur der isolierten Verbindung als 2-Desacetylchamissonolid, dessen natürliches Vorkommen bisher noch nicht beschrieben worden ist.

3. Isolierung und Identifizierung von Chamissonolid

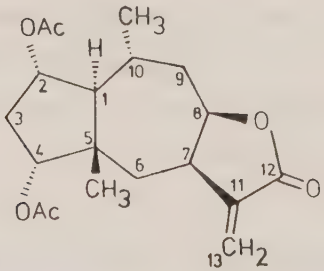
Aus der Teilfraktion III (120,5 mg) fielen bereits beim Einengen und Stehenlassen weiße, nadelförmige Kristalle



Chamissonolid

aus. Nach Umkristallisation aus Ethanol p.a. erwiesen sich diese in mehreren DC- und GC - Systemen einheitlich und mit Chamissonolid identisch. Nach Laufhöhe im DC - System 4 (hR_f 70) und Retentionszeit in GC - System 1 (RT 7,0 Min.) handelt es sich um Substanz 5 der S1 - Gesamtfraktion (s. Abb. 3, S. 13). Die Identität mit Chamissonolid wurde durch Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt und GC/MS - Analyse im direkten Vergleich mit der authentischen Verbindung weiter bewiesen (s. Exp. Teil, S. 111).

4. Identifizierung von 4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid



4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid

In Teilfraktion I (11,5 mg) wurde im DC eine hydroxamat - positive Substanz detektiert, die in Laufhöhe in mehreren DC - Systemen und Anfärbung mit Anisaldehyd/H_2SO_4 mit 4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid aus A. chamissonis ssp. incana (WILLUHN u. KRESKEN, 1981) übereinstimmte (Substanz 1, s. Abb. 3, S. 13).

Zur weiteren Identifizierung dieser Komponente wurde die Fraktion der GC- und GC/MS - Analyse zugeführt. Das Zumischen von authentischem 4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid bestätigte hierbei das Vorliegen dieser Verbindung. Auch das Massenspektrum stimmt mit dem zum Vergleich aufgenommenen Spektrum dieser Verbindung vollständig überein (s. Abb. 9). Die Verbindung zeigt keinen Molekülpeak. Als größtes Bruchstück tritt ein Fragment mit der Masse m/z 308 auf, das aus der Abspaltung einer Acetylgruppe als Keten resultierte (M^+ - 42). Die weitere Abspaltung

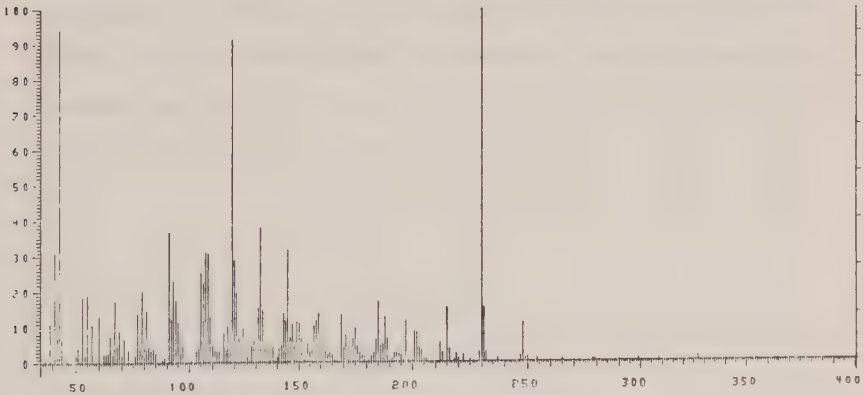
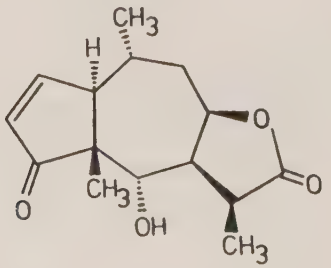


Abbildung 9: Massenspektrum von 4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid

von Wasser führt zu Fragment m/z 290, das nur in sehr geringer Intensität nachweisbar ist. Durch Abspaltung der zweiten Acetylgruppe als Keten sowie eines weiteren Moleküls Wasser entstehen die Fragmente m/z 248 bzw. 230. Letzteres bildete den Basispeak (M^+ - 2 HAc). Mit nur wenig geringerer Intensität (95 %) erscheinen die abgespaltenen Acetylgruppen mit der Masse m/z 43 im Spektrum. Auch das übrige Fragmentierungsmuster ist mit dem Spektrum der authentischen Vergleichssubstanz identisch (s. Exp. Teil, S. 111).
Die durchgeführten DC-, GC- und GC/MS - Analysen zeigen somit, daß dieses Sl auch in den Blüten der Unterart genuina von A. chamissonis auftritt.

5. Isolierung und Identifizierung von 11,13-Dihydrohelenalin

In Teilfraktion V (17,3 mg) wurde dc eine Verbindung nachgewiesen, die mit ZIMMERMANN - Reagenz ein violett gefärbtes Reaktionsprodukt ergab (s. Abb. 3, S. 13) und darin sowie in der Laufhöhe (hR_f 62, DC - System 4) mit 11,13-Dihydrohelenalin übereinstimmte.



11,13-Dihydrohelenalin

Eine Reindarstellung durch sc Auftrennung der Teilfraktion V war erfolglos. Durch präparative HPLC (System II) konnte jedoch eine nahezu einheitliche Fraktion aufgefangen werden (s. Exp. Teil, S. 112 und Abb. 45, S. 102), aus der nach Umkristallisierung aus Ether 2,7 mg gelblichweiße, dc und gc einheitliche Kristalle gewonnen wurden. Der Schmelzpunkt (229 - 232°C) und das UV - Absorptionsmaximum (λ_{max} 227 nm) stimmen mit den Angaben für 11,13-Dihydrohelenalin überein (POPLAWSKI u. Mitarb, 1971; ADAMS u. HERZ, 1949a,b). Das Massenspektrum (s. Abb. 10) zeigt den Molekülpeak bei M^+ = 264. Fragmente bei m/z 191, 124, 123, 122, 96 und 95 deuten auf das Vorliegen eines Pseudoguaianolides mit Sauerstoffunktionen an C-4, C-6 und C-8 (TSAI u. Mitarb., 1969; POPLAWSKI u. Mitarb., 1971). Ein bei m/z 246 (M^+ - 18) auftretendes Spaltprodukt resultiert aus der Abspaltung der Hydroxylgruppe als Wasser. Basispeak ist wie im zum Vergleich aufgenommenen Spektrum von 11,13-Dihydrohelenalin das Fragment mit der Masse m/z 124.

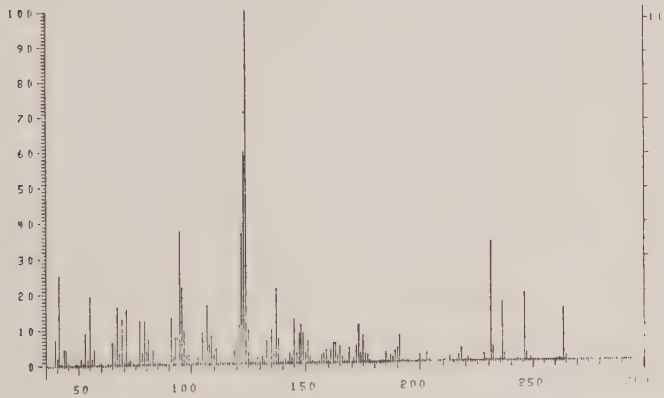


Abbildung 10: Massenspektrum von 11,13-Dihydrohelenalin

Auch das übrige Fragmentierungsmuster stimmt mit der Vergleichssubstanz überein. Auch gc erwies sich die isolierte Verbindung im direkten Vergleich mit authentischem 11,13-Dihydrohelenalin als identisch (s. Exp. Teil, S. 112). Somit wird auch 11,13-Dihydrohelenalin von den Blüten der Unterart genuina von A. chamissonis gebildet.

C. Untersuchungen zur Inhaltsstoffführung der Blütenkörbchen von Arnica sachalinensis (Regl.) A. Gray

I. Extraktion der Blüten, DC - Analyse und Fraktionierung des Extraktes

Wie in der Einleitung ausgeführt, sollte der Schwerpunkt der Analysen bei den Blüten von A. sachalinensis in der Identifizierung ihrer Sesquiterpenlactone liegen. 4,37 kg getrocknete und gemahlene Blütenkörbchen wurden deshalb in Anlehnung an POPLAWSKI u. Mitarb. (1971) und HERRMANN (1978) mit Petrolether erschöpfend extrahiert, der Extrakt mit 60%igem Ethanol ausgezogen und nach Abzug des Ethanols die wäßrige Phase mit Ether ausgeschüttelt. Als Rückstand der Etherausschüttelung resultierten 50,7 g einer dunkelgrüngelben, zähflüssigen Fraktion (= 1,16% vom Blütentrockengewicht). Analog wurden Blütenkörbchen von A. montana und A. chamissonis ssp. genuina extrahiert und die drei Extrakte dc in mehreren Fließmittel - Systemen vergleichend auf ihre Sl - Führung untersucht.

Abbildung 11 A zeigt das mit n-Pentan/Ether (32/68) entwickelte DC nach Detektion im UV - Licht (254 nm) sowie mit Anisaldehyd/H_2SO_4, Hydroxylamin/$FeCl_3$ und ZIMMERMANN - Reagenz. Wie daraus hervorgeht, ließen sich in den Blüten von A. sachalinensis die in A. montana und A. chamissonis ssp. genuina vorkommenden Sl nicht nachweisen. Die Fraktion enthielt lipophilere Bestandteile, die in dem gewählten Fließmittel praktisch ungetrennt an der Fließmittelfront lagen.

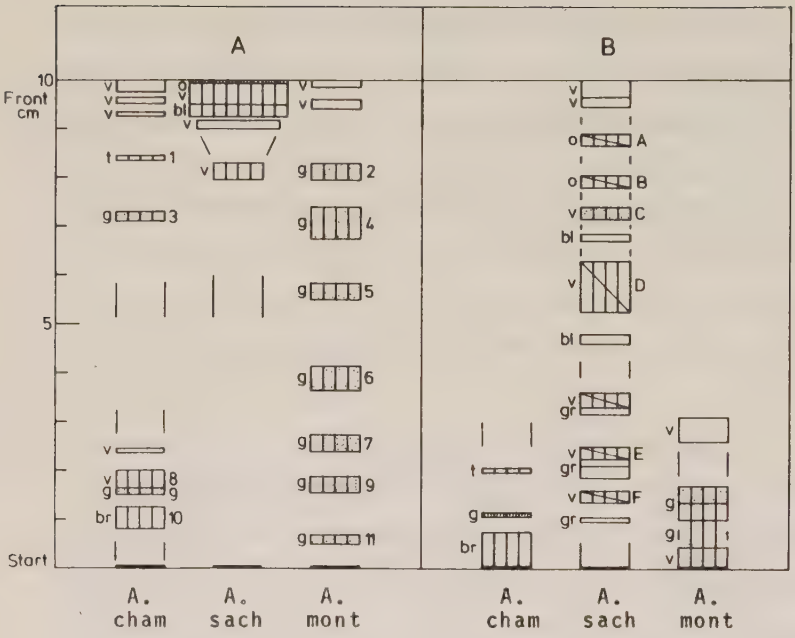


Abbildung 11: DC des Blütenextraktes von A. sachalinensis im Vergleich zu den entsprechenden Extrakten aus A. montana - und A. chamissonis - Blüten

Schicht: Kieselgel 60 F_{254}

Fließmittel: A: n-Pentan/Ether (32/68)
B: Benzol/Ethylacetat (90/10)

Detektion: UV bei 254 nm ▭ bzw. | | (schwach)

Hydroxylamin/$FeCl_3$ ▥; ZIMMERMANN-Reagenz ▩; NaOH/$FeCl_3$ ▨

Anisaldehyd/H_2SO_4 bl= blau; br= braun; g= gelb; gr= grau; o= orange; t= türkis-blau; v= violett

1= 4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid; 2= Helenalinisovalerianat; 3= Helenalintiglinat; 4= Helenalinester; 5= 11,13-Dihydrohelenalinester; 6= Helenalinacetat; 7= 11,13-Dihydrohelenalinacetat; 8= 6-Desoxychamissonolid; 9= Helenalin; 10= Chamissonolid; 11= 11,13-Dihydrohelenalin

Bessere Trennergebnisse wurden in den Fließmittel - DC - Systemen 6, 7, 8, 11 und 15 (s. Exp. Teil) erzielt. Abbildung 11 B zeigt die Auftrennung im System 11. Hier treten im DC des Extraktes aus A. sachalinensis sieben hydroxamat- und $FeCl_3$ - positive Komponenten auf. Nur eine davon (hR_f 72) ergab auch mit ZIMMERMANN - Reagenz ein violett gefärbtes Reaktionsprodukt wie bei den Sl der A. montana - Blüten. Mit Anisaldehyd/H_2SO_4 färbte sie sich jedoch nicht gelb sondern violett. Aufgrund der benutzten Detektionsreagenzien sollte es sich bei den Hauptkomponenten des A. sachalinensis - Extraktes hauptsächlich um Phenole bzw. Phenolester handeln. Die Substanz mit dem hR_f - Wert 57 (Substanz D) stellte dabei die Hauptkomponente dar. Die durchgeführten DC - Analysen ließen keine Rückschlüsse auf das Vorkommen ähnlich strukturierter Sl wie in den Blüten von A. montana und A. chamissonis zu.

Zur Isolierung der hydroxamat - positiven Verbindungen wurden 40 g des Blütenextraktes sc fraktioniert und die erhaltenen Fraktionen nach dc Kontrolle zu 9 Teilfraktionen vereinigt (s. Exp. Teil, S. 114). Abbildung 12 gibt die Zusammensetzung der Teilfraktionen wieder, aus denen die Verbindungen durch wiederholte SC und/oder präparative DC isoliert wurden.

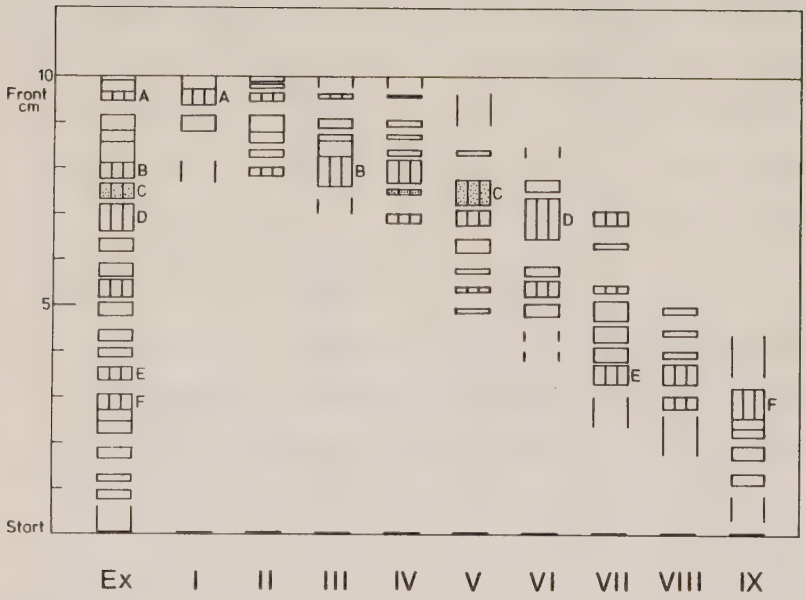


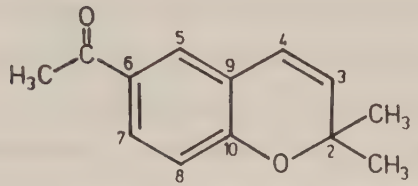
Abbildung 12: DC des Extraktes (Ex) und der nach sc Auftrennung erhaltenen Teilfraktionen I bis IX

Schicht: Kieselgel 60 F_{254} ; Fließmittel: Benzol/Ether (80/20)

Detektion: UV bei 254 nm ▭ bzw. | | (schwach)

Hydroxylamin/$FeCl_3$ ▭ ZIMMERMANN - Reagenz ▭

II. Isolierung und Identifizierung von Substanz C (6-Acetyl-2,2-dimethyl-2H-chromen = Desmethoxy-encecalin)



6-Acetyl-2,2-dimethyl-2H-chromen = Desmethoxy-encecalin

Durch wiederholte SC wurden aus Teilfraktion IV 72,5 mg der hydroxamat- und ZIMMERMANN - positiven Substanz C als hellgelbes Öl isoliert (s. Exp. Teil, S. 115). Das Massenspektrum (s. Abb. 13) zeigt einen Molekülpeak bei M^+ = 202. In Verbindung mit der CH - Analyse ergibt sich die Summenformel $C_{13}H_{14}O_2$. Den Basispeak bildet das erste Folgefragment bei m/z 187, das auf die Abspaltung einer Methylgruppe hinweist (M^+ - 15). Das Fragment mit

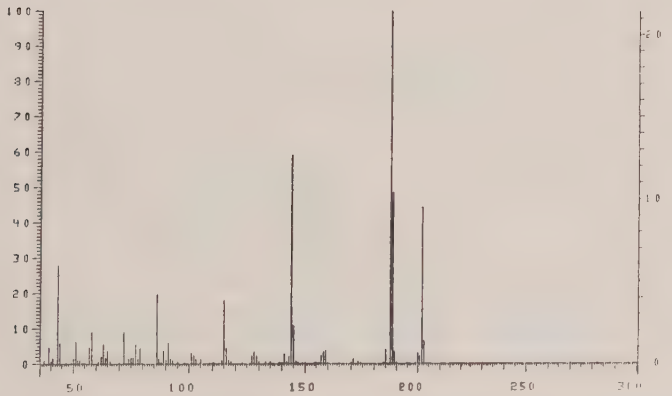


Abbildung 13: Massenspektrum von Substanz C (Desmethoxy-encecalin)

dem m/z - Wert 159 (M^+ - 43) spricht für die Abspaltung einer Acetylgruppe, die als Bruchstück bei m/z 43 auftritt. Ein weiteres intensives Bruchstück bei m/z 144 dürfte aus der Abspaltung einer Methylgruppe und einer Acetylgruppe resultieren (M^+ - 15 - 43). Fragmentpeaks bei m/z 91 und 65 sowie 105, 77 und 51 deuten auf einen alkylierten Aromaten bzw. ein Phenylderivat hin (HESSE u. Mitarb., 1979). Im Einklang mit einem substituierten Benzolderivat stehen auch die Absorptionsmaxima im UV - Spektrum bei 323,5, 310, 273, 254, 246 und 229 nm, unter denen das bei λ_{max} 254 nm das stärkste war (ϵ = 19614).
Auch im IR - Spektrum (s. Abb. 14) treten Signale für einen Aromaten bei 3040, 1600, 1570 und 1485 cm^{-1} auf, wobei die Banden bei 880 und 825 cm^{-1} für das Vorliegen einer 1,3,4-Trisubstitution sprechen. Die Absorption bei 1670 cm^{-1} deutet auf ein Arylketon hin, die bei 1640 cm^{-1} auf eine in Konjugation zum Aromaten stehende Doppelbindung.

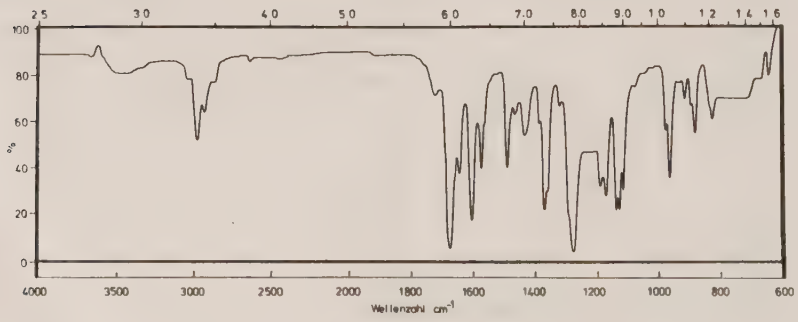


Abbildung 14: IR - Spektrum von Substanz C
(Desmethoxy-encecalin)

Ein Signal bei 1365 cm^{-1} läßt auf das Vorliegen von zwei geminalen Methylgruppen bzw. einer Isopropylgruppe schließen und Banden zwischen 1135 und 1110 cm^{-1} auf eine Ethergruppierung. Die Bande bei 1270 cm^{-1} ist typisch für die C-O - Valenzschwingung einer Acetylgruppe (HESSE u. Mitarb., 1979), die bereits dem MS entnommen werden konnte. Da eine Esterbande nicht auftritt, kann in Verbindung mit dem Signal für ein Arylketon (1670 cm^{-1}) das Vorliegen einer Acetophenonstruktur angenommen werden. Das zweite im Molekül auftretende Sauerstoffatom sollte in einer Ethergruppierung vorliegen.

Summenformel, MS-, UV- und IR - Spektren stehen im Einklang mit dem Vorliegen eines 6-Acetyl-2,2-dimethyl-2H-chromens. Literaturstudien ergaben, daß eine Verbindung dieser Struktur bereits von BOHLMANN u. Mitarb. (u.a. 1977a,c; 1978b; 1981a,c,d; 1982) in mehreren Asteraceen - Arten nachgewiesen worden ist. Die dort zu findenden Daten (BOHLMANN u. GRENZ, 1970) für das MS-, UV- und IR - Spektrum stimmen mit denen für Substanz C ermittelten überein. Zur weiteren Bestätigung dieser Struktur wurde zunächst ein ^{13}C-NMR - Spektrum aufgenommen (s. Abb. 15, S. 42). Dieses zeigt, daß die Verbindung 13 C - Atome besitzt, von denen 9 sp^2 - hybridisiert sind (Abb. 15 B). Aus den "gated decoupling" - Experimenten (Abb. 15 A) ergaben sich folgende Atomsorten: 5 $-\overset{\diagdown\,\diagup}{C}-$, 5 CH und 3 CH_3.

Das Spektrum zeigt ein Signal für ein neben Sauerstoff befindliches quartäres C - Atom bei 77,558 ppm, das dem C-2 zugeordnet werden kann. Ein Singulett bei 196,497 ppm zeigt

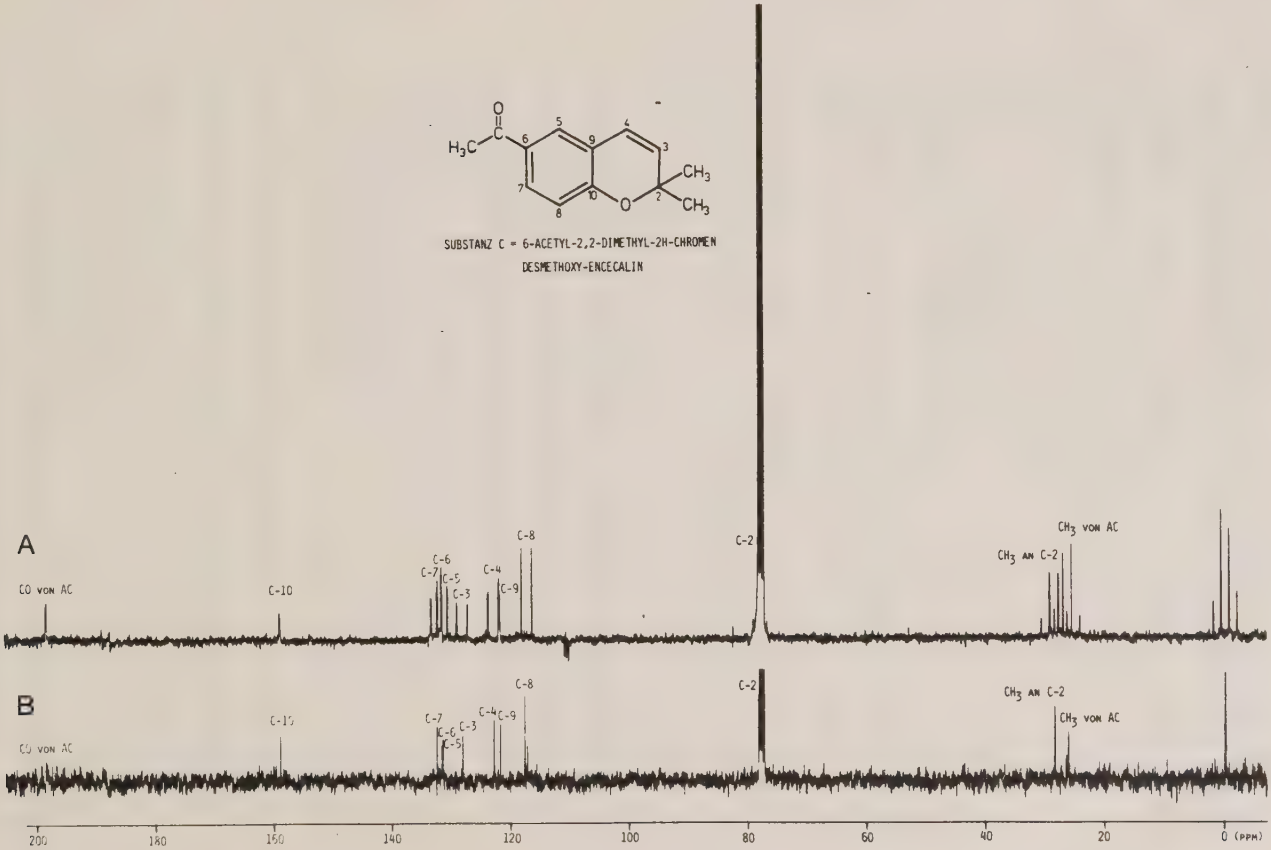


Abbildung 15: ^{13}C-NMR - Spektrum von Substanz C (6-Acetyl-2,2-dimethyl-2H-chromen = Desmethoxy-encecalin); A: "gated decoupling"; B: ^{1}H-breitbandentkoppelt

Tabelle 6: ^{13}C-NMR - Verschiebungen δ (ppm, rel. zu TMS = 0) von Substanz C in $CDCl_3$
s: Singulett; d: Dublett; q: Quartett

C - Atome	(δ) ppm
2	77,558 s
3	126,943 d
4	121,737 d
5	130,262 d
6	130,448 s
7	131,223 d
8	116,598 d
9	120,692 s
10	157,373 s
CO von Ac	196,497 s
CH_3 von Ac	26,201 q
CH_3 an C-2	28,408 q
CH_3 an C-2	28,408 q

die CO - Gruppe der Acetylfunktion an, das aufgrund der Konjugation zum Aromaten eine Tieffeldverschiebung erfährt. Die mit der Struktur eines 2H-Chromenderivates im Einklang stehende Einzelzuordnung aller 13 C - Atome gibt Tabelle 6 wieder.
Auch im ^1H-NMR - Spektrum (s. Abb. 16) zeigt die Verbindung die charakteristischen Signale eines Dimethylchromenderivates. Ein bei δ = 1,455 ppm lokalisiertes Singulett für 6 Protonen belegt die Anwesenheit von zwei äquivalen-

ten tertiären Methylgruppen. Das Signal der Methylgruppe der Acetylfunktion erscheint als Singulett bei 2,525 ppm. Die bei δ = 7,743, 7,617 und 6,793 ppm erscheinenden Signale für aromatische Protonen (dd, d bzw. q) sind nur mit einem 1,3,4-trisubstituierten Benzolderivat vereinbar, wobei gleichzeitig durch die Lage und die Kopplung dieser Protonen die Stellung der Acetylgruppe eindeutig lokalisiert wird. Die Signale der beiden olefinischen Protonen erscheinen jeweils als Dubletts bei 6,360 und 5,667 ppm. Aufgrund der Kopplungskonstante J = 10 Hz müssen die beiden Protonen cis - ständig sein.

Die Signale des ^{1}H-NMR - Spektrums der Substanz C stimmen mit denen von BOHLMANN u. GRENZ (1970) für 6-Acetyl-2,2-dimethyl-2H-chromen angegebenen überein (s. Tab. 7 und Tab. 8, S. 46). Die auch als Desmethoxy-encecalin bezeichnete Verbindung bildet ein kristallines 2,4-Dinitrophenylhydrazon. Das aus Substanz C hergestellte Hydrazonderivat ist mit diesem identisch (s. Exp. Teil, S. 116).

Nach den durchgeführten Untersuchungen handelt es sich bei Substanz C um 6-Acetyl-2,2-dimethyl-2H-chromen (Desmethoxy-encecalin). Es ist das erste Chromenderivat, das in der Gattung Arnica nachgewiesen worden ist.

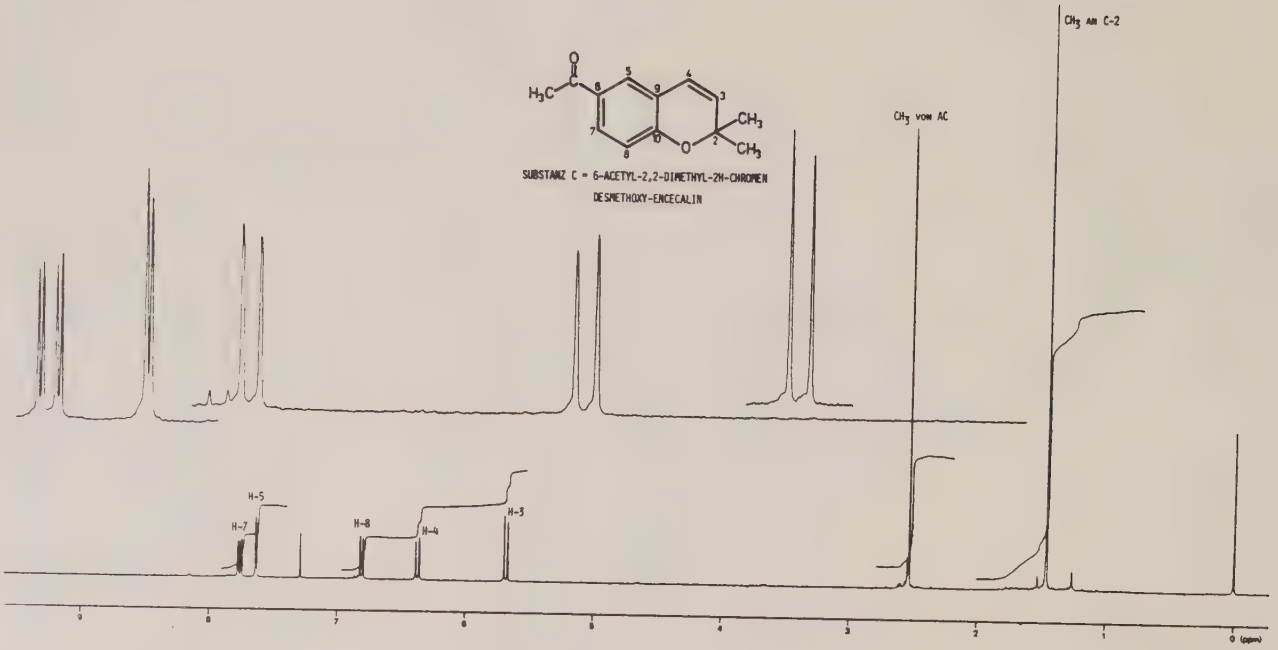


Abbildung 16: ^{1}H-NMR - Spektrum von Substanz C (6-Acetyl-2,2-dimethyl-2H-chromen = Desmethoxy-encecalin)

Tabelle 7: ^{1}H-NMR - Verschiebungen δ (ppm, rel. zu TMS = 0) von Substanz C in $CDCl_3$

s: Singulett; d: Dublett

Protonen	Substanz C	Desmethoxy-encecalin*
3	5,667 d	5,56 d
4	6,360 d	6,30 d
5	7,617 d	7,49 d
7	7,743 dd	7,64 dd
8	6,793 d	6,68 d
gem. CH_3 an C-2	1,455 s	1,42 s
CH_3 von Ac	2,525 s	2,44 s

*BOHLMANN u. GRENZ (1970) in CCl_4

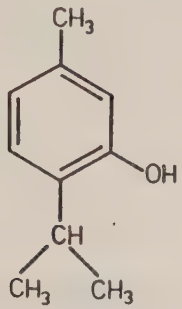
Tabelle 8: Kopplungskonstanten J (Hz) von Substanz C in $CDCl_3$

J	Substanz C	Desmethoxy-encecalin*
3,4	10	9,5
5,7	2,1	2
7,8	8,5	8

*BOHLMANN u. GRENZ (1970) in CCl_4

III. Isolierung und Identifizierung von Thymol und einzelner Thymolderivate

1. Isolierung und Identifizierung von Thymol (Substanz B)



Thymol

Die in Teilfraktion IV auftretende phenolische Verbindung (Substanz B, s. Abb. 12, S. 38) war dc und gc identisch mit Thymol. Nach sc Reinigung der Fraktion wurde die in einer Teilfraktion anfallende Komponente in Chloroform aufgenommen, mit Natronlauge ausgeschüttelt und aus den vereinigten Phasen nach Ansäuern mit Ether extrahiert. Nach Abzug des Lösungsmittels und Umkristallisation aus Ethanol wurden 64,5 mg weißlich-gelbe, dc und gc einheitliche Kristalle gewonnen (s. Exp. Teil, S. 117).

Der Schmelzpunkt (50 - 52°C) und das UV - Spektrum (λ_{max} 272 nm, Schulter bei 281 nm; ϵ = 2188) stimmen mit den Literaturangaben für Thymol überein (SCHULTE u. Mitarb., 1963; SCHULTE u. ROCKER, 1966; WILLUHN, 1972c).

Das IR - Spektrum ist mit dem von Thymol identisch, desgleichen das Massenspektrum (s. Abb. 17). Dieses zeigt den Molekülpeak bei M^+ = 150 und das erste Folgefragment bei

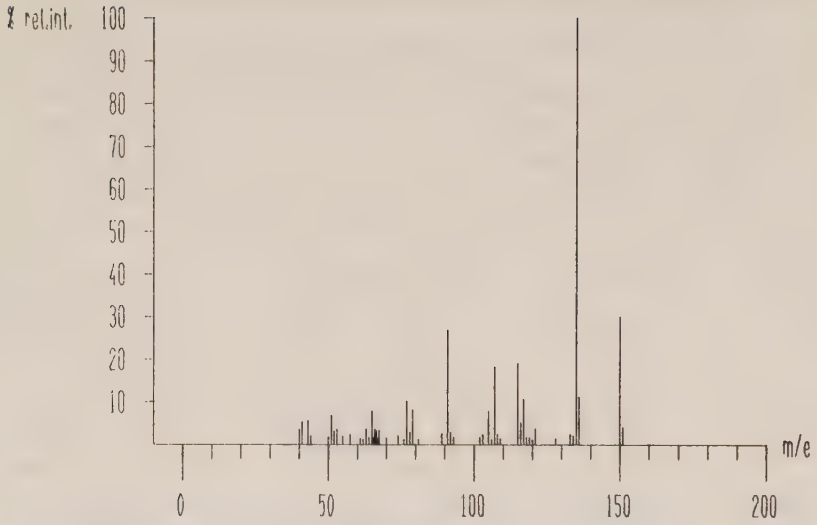
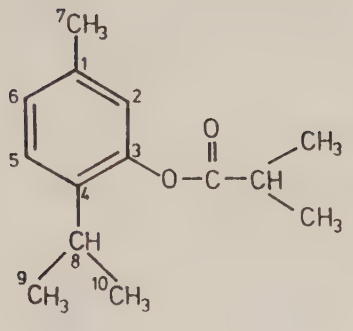


Abbildung 17: Massenspektrum von Thymol

m/z 135, das aus der Abspaltung der Methylgruppe resultiert (M^+ - 15). Weiterhin treten die für Thymolverbindungen charakteristischen Fragmente bei m/z 105, 91, 77, 65 und 51 auf (von SYDOW, 1963; SHTACHER u. KASHMAN, 1971).
Aufgrund der durchgeführten Analysen handelt es sich bei Substanz B um Thymol.

2. Isolierung und Identifizierung von Thymolisobutyrat (Substanz A)

In Teilfraktion I (0,32 g) wurde dc eine Verbindung nachgewiesen, die mit Anisaldehyd/H_2SO_4 wie Thymol ein orangefarbenes Reaktionsprodukt lieferte (s. Abb. 12, S. 38). Durch zweimalige präparative DC (System 7) konnte diese als dc und gc einheitliches Öl (6,8 mg) isoliert werden (s. Exp. Teil, S. 118).



Thymolisobutyrat

Das Massenspektrum der Verbindung (s. Abb. 18) zeigt den Molekülpeak bei m/z 220. Das erste Folgefragment bei m/z 150 besitzt die Masse von Thymol, dessen Spaltprodukte sämtlich im Spektrum auftreten. Es sollte aus der Abspaltung einer gesättigten C_4 - Säure als ungeladenes Ketenderivat resultieren. Das Acylfragment dieser Buttersäure erscheint bei m/z 71 (siehe auch Fragment m/z 149), aus dem durch Abspaltung der CO - Gruppe das Spaltprodukt m/z 43 resultiert.

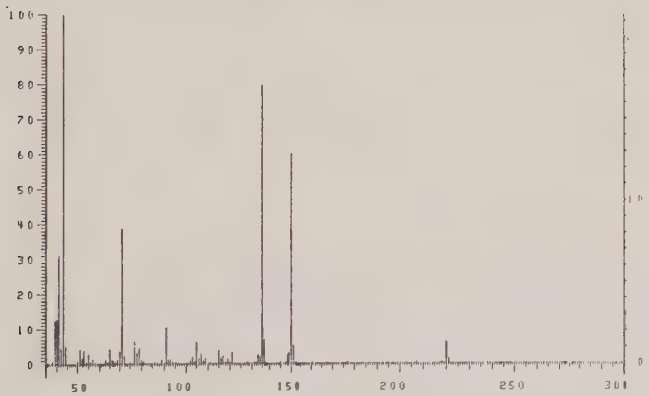


Abbildung 18: Massenspektrum von Thymolisobutyrat

Dieses Fragment bildet den Basispeak und kann darüber hinaus auch durch Abspaltung der Isopropylgruppe $(C_3H_7)^+$ von Thymol gebildet werden.

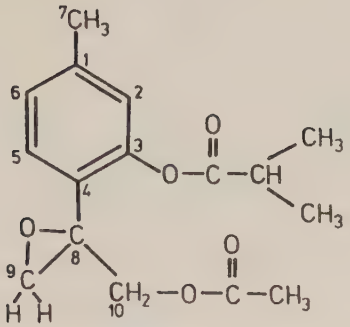
Aufgrund des Massenspektrums handelt es sich bei der Verbindung um einen Buttersäureester von Thymol. Von WILLUHN (1972c) ist aus dem ätherischen Öl der unterirdischen Organe von A. sachalinensis Thymolisobutyrat isoliert und gc sein Vorkommen auch im ätherischen Öl der Blüten nachgewiesen worden. Die isolierte Substanz A stimmte dc in fünf DC - Systemen und gc mit dieser Vergleichssubstanz überein. Massenspektrum und UV - Spektrum (λ_{max} 272,5 und 265 nm) waren mit den Vergleichsspektren von Thymolisobutyrat identisch.

Zur Bestätigung, daß es sich bei der im MS nachgewiesenen C_4 - Säure um die Isobuttersäure handelte, wurde die Verbindung hydrolysiert (s. Exp. Teil, S. 118). Die hierbei neben Thymol anfallende Säure wurde gc als Isobuttersäure identifiziert (RT 3,5 Min., n-Buttersäure RT 4,4 Min., GC - System 8).

Durch die Isolierung wird das durch GC - Analyse nachgewiesene Vorkommen von Thymolisobutyrat in den Blüten von A. sachalinensis bestätigt.

3. Isolierung und Identifizierung von Substanz D (10-Acetoxy-8,9-epoxy-thymol-isobutyrat)

Aus Teilfraktion VI (s. Abb. 12, S. 38) wurden durch wiederholte sc und präparative HPLC 259 mg der phenolischen Substanz D dc und gc einheitlich isoliert. Die fast farb-



10-Acetoxy-8,9-epoxy-thymol-isobutyrat

lose ölige Verbindung zeigt im MS (Abb. 19) den Molekülpeak bei m/z 292. In Verbindung mit der CH - Analyse ergibt sich die Summenformel $C_{16}H_{20}O_5$. Das erste Folgefragment bei m/z 262 (M^+ - 30) weist auf die Abspaltung einer CH_2O - Gruppe hin und spricht damit für das Vorliegen eines cyclischen Ethers oder eines aromatischen Methoxyderivates. Das zweite Folgefragment bei m/z 232 (M^+ - 60) deutet auf ein O-Acetylderivat hin, von dem die Essigsäure als $C_2H_4O^+$ - Fragment (m/z 60) abgespalten wird (HESSE u. Mitarb., 1979). Das Fragment bei m/z 221 weist in Verbindung mit dem Spaltprodukt bei m/z 71 auf einen Buttersäureester hin, wobei der Basispeak bei m/z 43 aus der Abspaltung der CO - Gruppe vom Acylrest der Buttersäure resultieren dürfte (71 - CO). Das intensive Fragment bei m/z 162 läßt sich aus der Abspaltung der Buttersäure als Ketenderivat vom zweiten Folgefragment bei m/z 232 erklären (M^+ - 60 - 70). Auf ein Benzyl- bzw. Phenylderivat

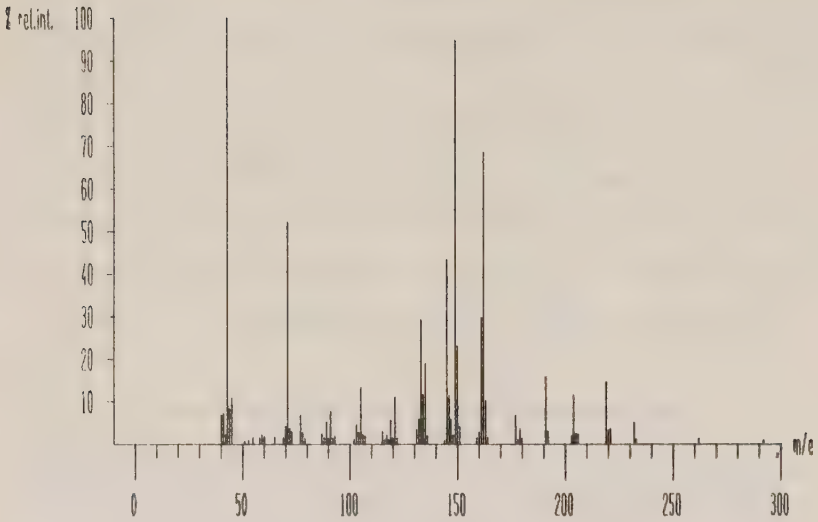


Abbildung 19: Massenspektrum von Substanz D
(10-Acetoxy-8,9-epoxy-thymol-isobutyrat)

deuten wie bei Thymol die Fragmente mit den m/z - Werten 105, 91, 77, 65 und 51 hin. Mit einem Phenolderivat im Einklang stehen die UV - Absorptionsmaxima bei 264,5 und 272,5 nm. Im IR - Spektrum (Abb. 20) erscheinen dementsprechend die Signale für einen Aromaten bei 3035, 1620, 1575 und 1505 cm^{-1}. In Übereinstimmung mit den Befunden des MS zeigt die Verbindung hier eine breite Esterbande bei 1745 cm^{-1} und eine Acetatgruppe bei 1240 cm^{-1}. In Verbindung mit dem bei 1140 und 1095 cm^{-1} auftretenden Etherbanden können die bei 1250, 920 und 820 cm^{-1} auftretenden Absorptionsbanden als Signale einer Epoxidgruppierung interpretiert werden. Die im MS abgespaltene CH_2O - Gruppe sollte deshalb als cyclischer Ether vorlie-

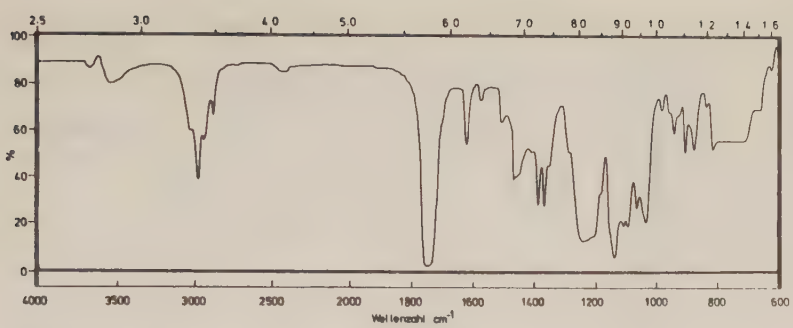


Abbildung 20: IR - Spektrum von Substanz D
(10-Acetoxy-8,9-epoxy-thymol-isobutyrat)

gen. Ein fast symmetrisches Dublett bei 1390 und 1370 cm^{-1} deutet auf eine Isopropylgruppe hin, so daß es sich bei der im MS nachgewiesenen Buttersäure um die Isobuttersäure handeln könnte.

Die Summenformel, die Fragmentierung im MS, die UV- und IR - Daten der isolierten Verbindung stehen insgesamt im Einklang mit der Struktur eines 10-Acetoxy-8,9-epoxy-thymol-isobutyrats. Mit dieser Struktur in Übereinstimmung stehen auch die Daten des ^{13}C-NMR - Spektrums (s. Abb. 21, S. 54). Das ^{1}H-breitbandentkoppelte Spektrum zeigt 16 C - Atome, von denen 8 sp^2 - hybridisiert sind. Aus den "gated decoupling" - Experimenten ergeben sich folgende Atomsorten: 6 $-\overset{\diagdown\,\diagup}{C}-$, 4 CH , 2 CH_2 und 4 CH_3.

Im Einklang mit dem Vorliegen eines 8,9-Epoxy-thymolderivates tritt im Spektrum ein Singulett für ein neben Sauerstoff befindliches quartäres C - Atom bei δ = 56,504 ppm (C-8) auf. Weiterhin entnimmt man dem

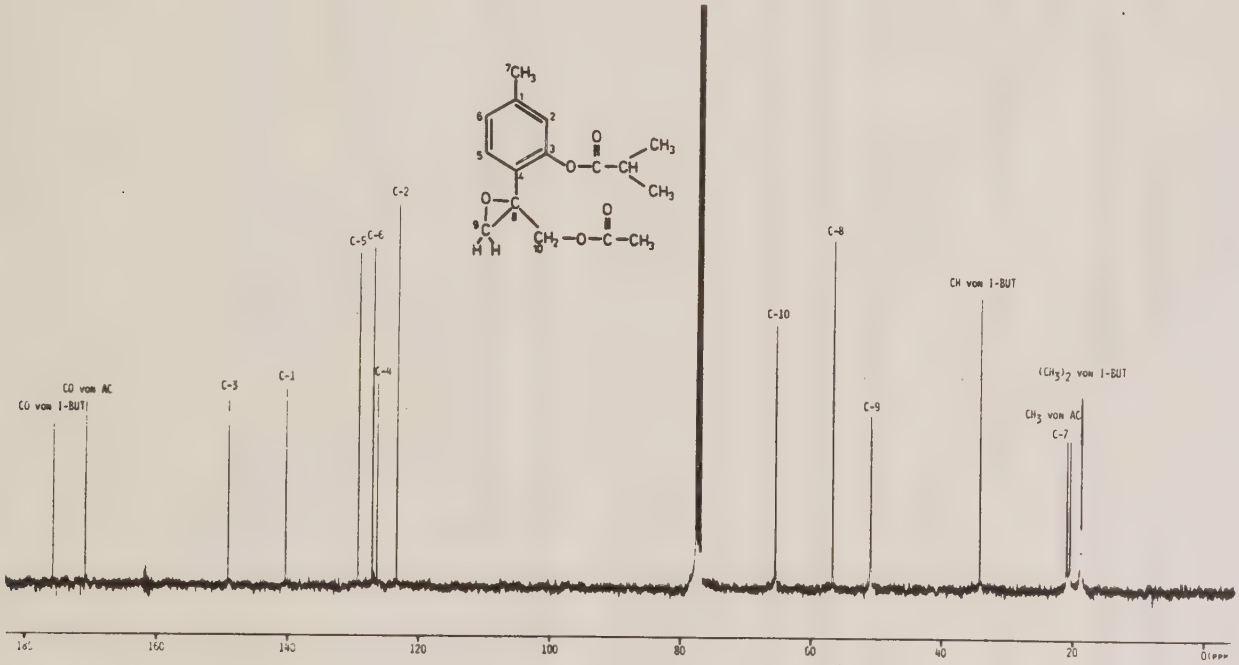


Abbildung 21: ^{13}C-NMR - Spektrum von Substanz 3 (10-Acetoxy-8,9-epoxy-thymol-isobutyrat)

Tabelle 9: ^{13}C-NMR - Daten von Substanz D in $CDCl_3$ (δ rel. zu TMS = 0; s: Singulett; d: Dublett; t: Triplett; q: Quartett

C-Atome	δ (ppm)	Multiplizität
1	139,724	s
2	122,843	d
3	148,502	s
4	125,843	s
5	128,748	d
6	126,582	d
7	20,912	q
8	56,504	s
9	50,743	t
10	65,202	t
CO von Ac	170,149	s
CH_3 von Ac	20,447	q
CO von i-But	175,044	s
CH von i-But	34,022	d
$(CH_3)_2$ von i-But	18,797	q
	18,730	q

unter Bedingungen des "gated decoupling" aufgenommen Spektrum zwei Singuletts für die CO - Gruppen des Isobutyryl- und Acetylrestes (δ = 175,044 bzw. 170,149 ppm). Die verbleibenden sechs sp^2 - hybridisierten C - Atome lassen sich dem Aromaten zuordnen. Ihre Einzelzuordnung sowie die Zuordnung der vier Quartetts für die vier CH_3 - Gruppen

der Verbindung und die der anderen C - Atome können der Tabelle 9, S. 55 entnommen werden.

Das ^{1}H-NMR - Spektrum (s. Abb. 22, S. 57) zeigt ein Singulett für die aromatische CH_3 - Gruppe an C-1 (δ = 2,330 ppm) und ein Singulett für die CH_3 - Gruppe des Acetylrestes (δ = 2,008 ppm). Ein Dublett für sechs Protonen (J = 7 Hz) wird von den beiden äquivalenten Methylgruppen des Isobutyrylrestes hervorgerufen. Das hiermit koppelnde Methinproton erscheint als Septett (qq) bei 2,828 ppm. Im Resonanzbereich der aromatischen Protonen sind drei Signale lokalisiert, die die Verbindung als einen 1,3,4-trisubstituierten Aromaten ausweist. Zwei als Dubletts erscheinende Signale bei 7,313 und 7,005 ppm zeigen einen Dacheffekt und eine Kopplungskonstante von jeweils J = 7,9 Hz. Sie werden von den ortho-ständigen Protonen H-5 und H-6 hervorgerufen. Das dritte als Singulett bei 6,827 ppm erscheinende Signal ist H-2 zuzuordnen. Das Signal zeigt eine deutliche Linienverbreiterung, die auch im Dublett bei 7,005 ppm wiederzufinden ist und damit die unter 1 Hz liegende Kopplung der beiden meta-ständigen Protonen anzeigt. Bei 3,013 und 2,782 ppm treten die Signale eines AB - Systems auf, deren chemische Verschiebung charakteristisch ist für eine CH_2 - Gruppe in einem Dreiring neben Sauerstoff (HESSE u. Mitarb., 1979) und somit dem Proton an C-9 zugewiesen werden muß. Ein weiteres AB - System einer CH_2 - Gruppe tritt bei 4,498 und 4,187 ppm auf und ist dem Proton an C-10 zuzuordnen.

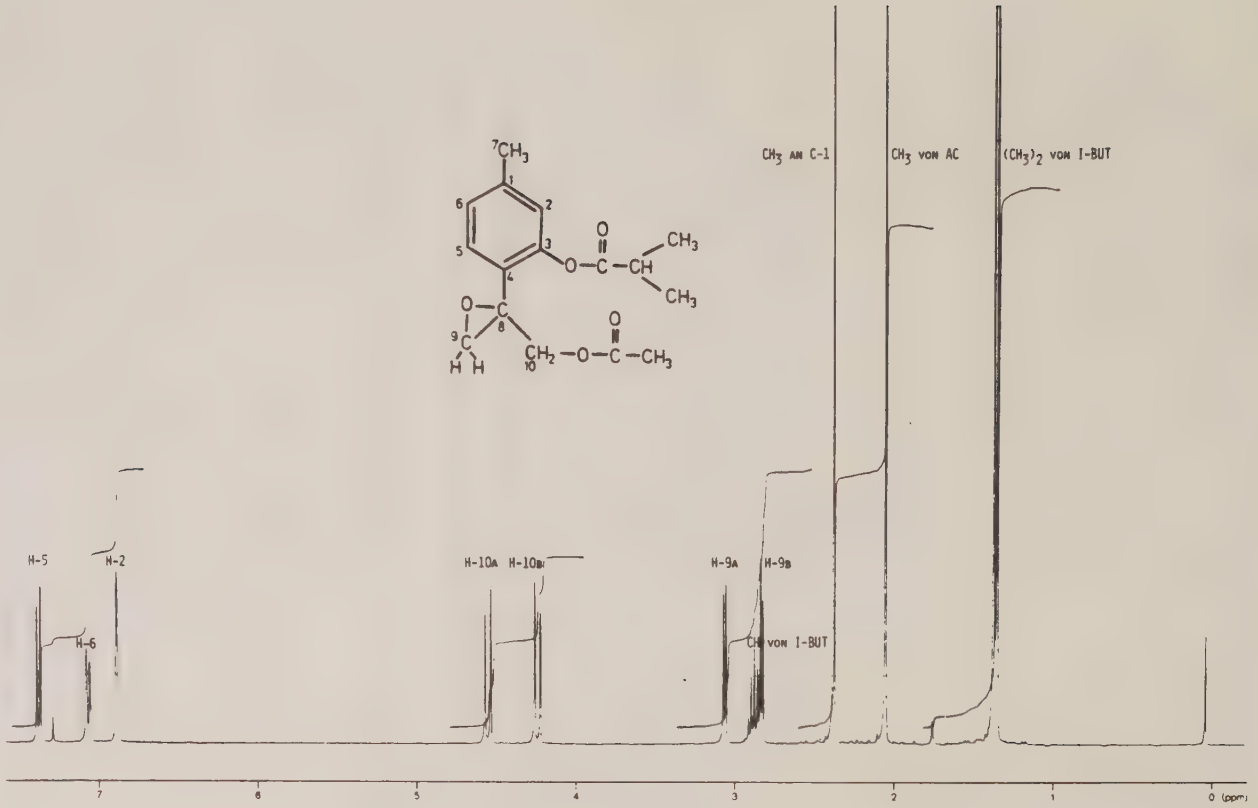


Abbildung 22: ^{1}H-NMR - Spektrum von Substanz D (10-Acetoxy-8,9-epoxy-thymol-isobutyrat)

Tabelle 10: ^{1}H-NMR - Verschiebungen δ (ppm, rel. zu TMS = 0) und Multiplizitäten von Substanz D in $CDCl_3$

s: Singulett; d: Dublett; q: Quartett

Protonen	Substanz D	10-Acetoxy-8,9-epoxy-thymol-isobutyrat*
2	6,827 s (br)	6,76 s (br)
5	7,313 d	7,26 d
6	7,005 d (br)	6,93 d (br)
9a	3,013 d	2,85 d
9b	2,782 d	2,62 d
10a	4,498 d	4,38 d
10b	4,187 d	4,10 d
CH_3 an C-1	2,330 s	2,33 s
CH_3 von Ac	2,008 s	1,93 s
CH von i-But	2,828 qq	2,77 qq
$(CH_3)_2$ von i-But	1,322 d	1,28 d

*BOHLMANN u. ZDERO (1976), in CCl_4

Tabelle 11: Kopplungskonstanten J (Hz) von Substanz D in $CDCl_3$

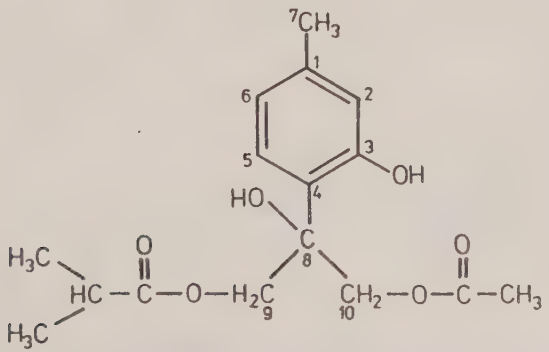
J	Substanz D	10-Acetoxy-8,9-epoxy-thymol-isobutyrat*
2,6	1	-
5,6	7,9	8,0
9a,9b	5,4	5,5
10a,10b	(-) 12,1	(-) 12,0
CH,$(CH_3)_2$ von i-But	7,0	7,0

*BOHLMANN u. ZDERO (1976), in CCl_4

Die chemischen Verschiebungen und Aufspaltungsmuster des ^{1}H-NMR - Spektrums belegen somit die Struktur der Verbindung als 10-Acetoxy-8,9-epoxy-thymol-isobutyrat (= 10-Acetoxy-8,9-epoxy-3-O-isobutyryl-thymol). Dieser Diester des Thymolepoxids ist kurz vorher erstmals von BOHLMANN u. ZDERO (1976) im Kraut von Wedelia forsteriana gefunden worden. Die dort angegebenen ^{1}H-NMR - Daten stimmen mit denen der aus A. sachalinensis isolierten Verbindung überein (s. Tab. 10 und 11, S. 58).

4. Isolierung und Identifizierung von Substanz F (10-Acetoxy-8-hydroxy-9-isobutyryloxy-thymol)

Aus Teilfraktion IX (s. Abb. 12, S. 38) wurden durch wiederholte SC und präparative HPLC 94,2 mg der Substanz F isoliert. Die hellgelbe, viskose Verbindung war danach dc und gc einheitlich (s. Exp. Teil, S. 120).
Das Massenspektrum (Direkteinlaß, s. Abb. 23) zeigt den Molekülpeak bei M^+ = 310. In Verbindung mit der CH - Ana-



10-Acetoxy-8-hydroxy-9-isobutyryloxy-thymol

lyse ergibt sich die Summenformel $C_{16}H_{22}O_6$. Das im Massenspektrum auftretende Fragment m/z 292 (M^+ - 18) deutet darauf hin, daß zumindest eine der Sauerstoffunktionen als Hydroxylgruppe vorliegt, die als Wasser abgespalten werden kann. Das Fragmentierungsmuster der Verbindung zeigt große Ähnlichkeit mit dem von 10-Acetoxy-8,9-epoxy-thymol-isobutyrat (Substanz D, vgl. Abb. 19, S. 52). Neben den auf ein Benzyl- bzw. Phenylderivat hinweisenden Spaltprodukte bei m/z 105, 91, 77, 65 und 51 treten als intensive Peaks auch hier die Fragmente m/z 162, 149, 145, 135, 133 und 121 auf, so daß es sich ebenfalls um ein Thymolderivat handeln sollte. Der Basispeak bei m/z 43 und das Fragment bei m/z 71 deuten in Verbindung mit der Summenformel auch

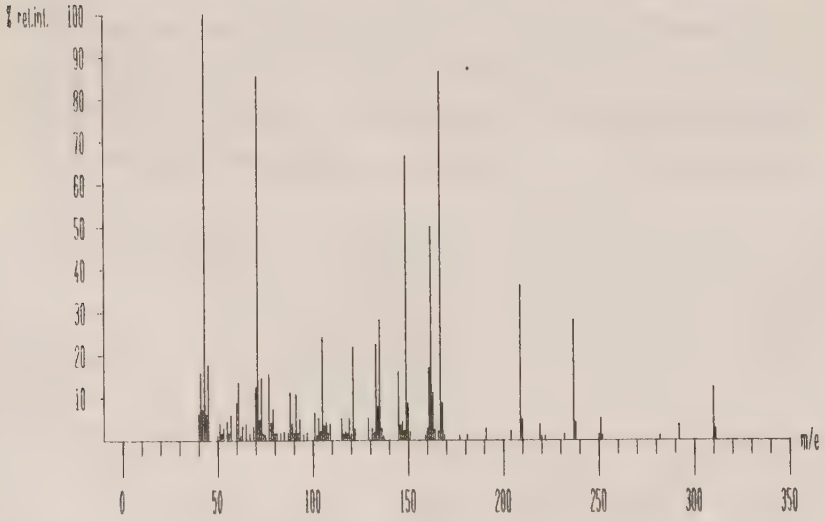


Abbildung 23: Massenspektrum von Substanz F
(10-Acetoxy-8-hydroxy-9-isobutyryloxy-thymol)

hier auf das Vorliegen einer Essig- und Buttersäure hin. Wie bei Substanz D tritt ein Fragment M^+ - 60 (m/z 250) auf, das das Vorliegen einer O-Acetylverbindung vermuten läßt, von der die Essigsäure als $C_2H_4O_2^+$ - Bruchstück abgespalten wird. Ein mit geringerer Intensität bei M^+ - 88 (m/z 222) auftretendes Bruchstück kann in gleicher Weise aus der Abspaltung einer Buttersäure als $C_4H_8O_2^+$ - Fragment resultieren, das bei m/z 88 im Spektrum auftritt. Das Fragment bei m/z 162 könnte aus der Abspaltung der beiden Säuren hervorgehen (M^+ - 60 - 88). Im unter den Bedingungen der GC/MS - Kopplung aufgenommenen Spektrum tritt es als größtes Fragment auf. Unter der Voraussetzung, daß hier ebenfalls ein Thymolderivat vorliegt, deutet dieses und die Tatsache, daß aufgrund der intensiven Färbung mit Echtblausalz B in der Verbindung eine freie phenolische OH - Gruppe vorliegen sollte, darauf hin, daß die beiden Säuren an der Isopropylgruppe gebunden sind. Die beiden charakteristischen, intensiven Folgefragmente bei

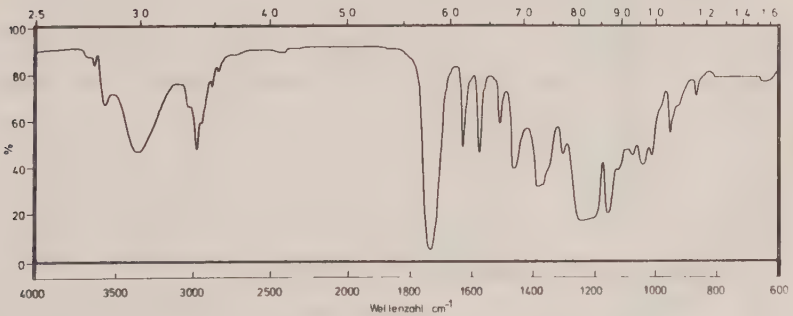


Abbildung 24: IR - Spektrum von Substanz F
(10-Acetoxy-8-hydroxy-9-isobutyryloxy-thymol)

Tabelle 12: ^{13}C-NMR - Verschiebungen δ (ppm, rel. zu TMS = 0) und Multiplizitäten von Substanz F und D in $CDCl_3$
s: Singulett; d: Dublett; t: Triplett; q: Quartett

C-Atome	Substanz F		Substanz D	
1	140,026	s	139,724	s
2	118,427	d	122,843	d
3	156,186	s	148,502	s
4	119,426	s	125,843	s
5	126,483	d	128,748	d
6	120,641	d	126,582	d
7	20,925	q	20,912	q
8	77,940	s	56,504	s
9	67,301*	t	50,743	t
10	67,141*	t	65,202	t
CO von Ac	171,302	s	170,149	s
CH_3 von Ac	20,733	q	20,447	q
CO von i-But	177,432	s	175,044	s
CH von i-But	33,972	d	34,022	d
$(CH_3)_2$ von i-But	18,807	q	18,797	q

*Zuordnung noch vertauschbar

m/z 237 (M^+ - 73) und m/z 209 (M^+ - 101) können danach aus der Abspaltung des Acetyl- bzw. Butyrylrestes unter Mitnahme der Methylengruppe resultieren (CH_3-CO-O-CH_2^+ bzw. C_3H_7-CO-O-CH_2^+), aus denen dann durch Abspaltung der Methylengruppe die Fragmente m/z 43 bzw. m/z 71 hervorgehen.

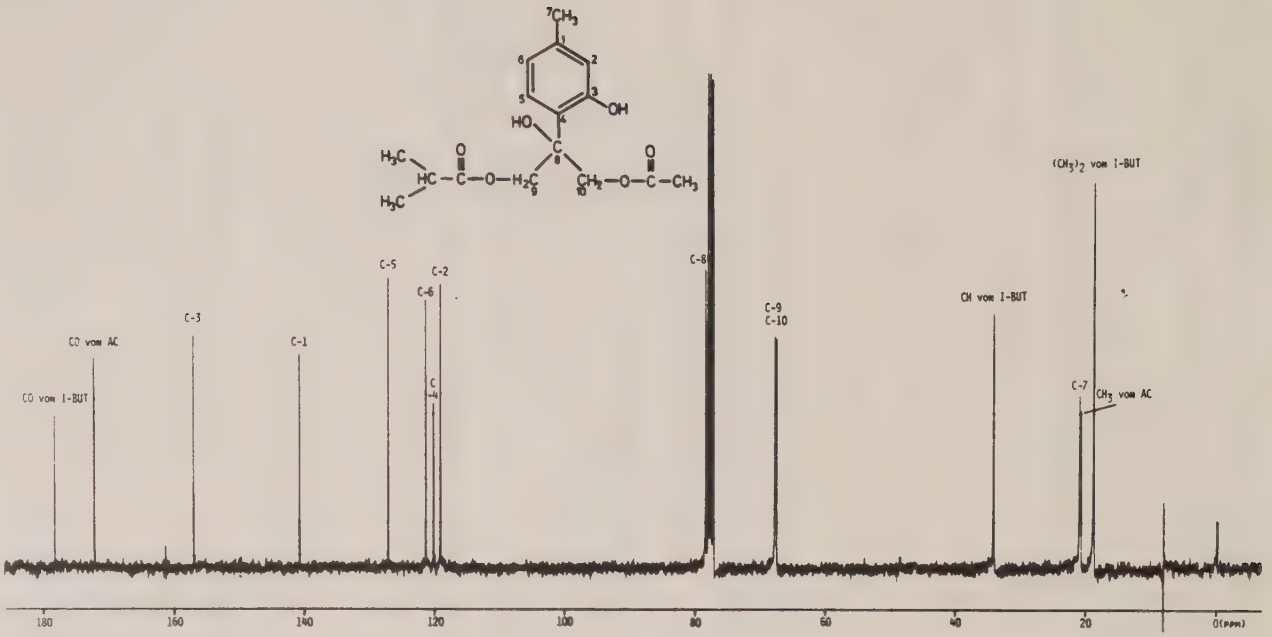


Abbildung 25: ^{13}C-NMR - Spektrum von Substanz F (10-Acetoxy-8-hydroxy-9-isobutyryloxy-thymol)

Das IR - Spektrum (Abb. 24, S. 61) zeigt die Signale für einen Aromaten bei 3035, 1625, 1575 und 1505 cm^{-1}, für zwei Hydroxylgruppen bei 3560 und 3360 cm^{-1} und für eine Esterbande bei 1735 cm^{-1}.

Dem ^{13}C-NMR - Spektrum (s. Abb. 25, S. 63) können 16 C-Atome entnommen werden, von denen acht sp^2 - hybridisiert sind. Die aus den "gated decoupling" - Experimenten ermittelten Atomsorten, 6 $-\overset{\backslash /}{C}-$, 4 CH , 2 CH_2 , 4 CH_3 , entsprechen denen von Substanz D, dessen ^{13}C-NMR - Spektrum mit dem der vorliegenden Verbindung große Ähnlichkeit besitzt. Die Einzelzuordnung der C-Atome ist in Tab. 12 wiedergegeben und derjenigen von Substanz D aus Tab. 9, S. 55 gegenübergestellt. Die sich aus dem Vergleich der ^{13}C-NMR - Daten unter Berücksichtigung der MS - Daten für die Verbindung ergebende Struktur steht im Einklang mit dem Vorliegen eines 10-Acetoxy-8-hydroxy-9-isobutyryloxy-thymols. Das Singulett für das einzige neben Sauerstoff befindliche quartäre C-Atom der Verbindung ist im Vergleich zu Substanz D um 21,436 ppm ins tiefere Feld verschoben, so daß hier an C-8 eine der beiden freien OH - Gruppen lokalisiert sein sollte. Eine Tieffeldverschiebung von 16,558 ppm erfährt auch das Signal von C-9, dessen Shiftwert hier dem von C-10 entspricht und deshalb wie dieses eine O-Acylfunktion tragen sollte. Weiterhin zeigt das Signal von C-3 gegenüber Substanz D eine Tieffeldverschiebung von 7,684 ppm, die durch die fehlende Esterfunktion erklärt werden kann, so daß hier die zweite freie OH - Gruppe der Verbindung lokalisiert sein sollte. Alle weiteren Signale entsprechen

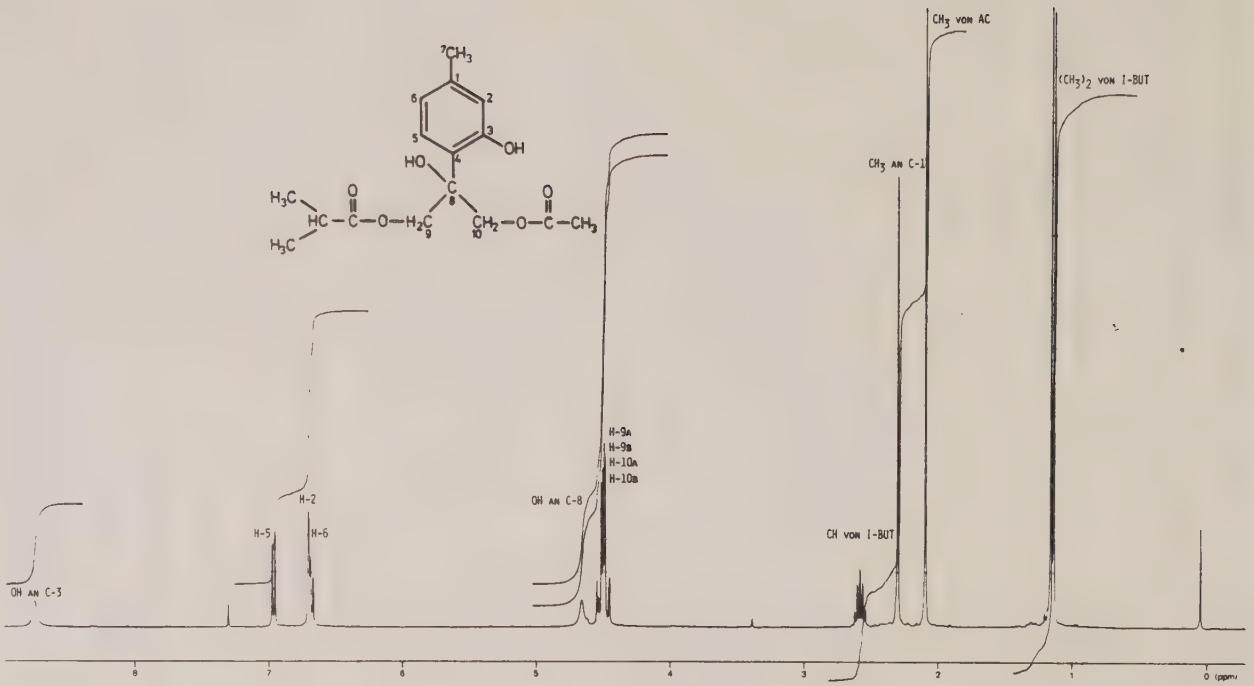


Abbildung 26: ^{1}H-NMR - Spektrum von Substanz F (10-Acetoxy-8-hydroxy-9-isobutyryloxy-thymol)

Tabelle 13: ^{1}H-NMR - Daten von Substanz F (10-Acetoxy-8-hydroxy-9-isobutyryloxy-thymol) in $CDCl_3$ (rel. zu TMS = 0)
s: Singulett; d: Dublett; q: Quartett

Protonen	(ppm)	J	Hz
2	6,638 s (br)	2,6	1
5	6,900 d	5,6	7,8
6	6,617 d (br)	9a,9b	(-) 11,7
9a	4,456 d	10a,10b	(-) 11,7
9b	4,420 d	CH,$(CH_3)_2$ von i-But	6,9
10a	4,469 d		
10b	4,423 d		
CH_3 an C-1	2,248 s		
CH_3 von Ac	2,040 s		
CH von i-But	2,527 qq		
$(CH_3)_2$ von i-But	1,102 d		
OH an C-3	8,673 s (br)		
OH an C-8	4,600 s (br)		

in ihren chemischen Verschiebungen und Multiplizitäten denen von Substanz D.

Das ^{1}H-NMR - Spektrum (s. Abb. 26, S. 65) weist die Verbindung, wie bei Substanz D bereits diskutiert, als 1,3,4-trisubstituierten Aromaten aus. Eine tertiäre Methylgruppe erscheint als Singulett bei 2,248 ppm, die aufgrund ihrer Tieffeldverschiebung am Aromaten lokalisiert sein sollte. Ein weiteres Singulett bei 2,040 ppm belegt die Anwesenheit einer Acetylgruppe. Ein Dublett für sechs Protonen

bei 1,102 ppm wird von den beiden äquivalenten Methyl-gruppen der Isobuttersäure hervorgerufen. Das mit diesem koppelnde Methinproton erscheint als Septett bei 2,527 ppm. Desweiteren treten zwei AB - Systeme für zwei CH_2O - Gruppen bei 4,469 und 4,423 ppm bzw. 4,456 und 4,420 ppm auf, die den Protonen an C-9 bzw. C-10 zugeordnet werden können und damit die tertiäre Natur der OH - Gruppe an C-8 belegen. Ein bei 8,673 ppm lokalisiertes breites Singulett ist der aromatischen OH - Gruppe an C-3 zuzuordnen, ein weiteres breites Singulett bei 4,600 ppm der tertiären OH - Gruppe an C-8. Die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten des ^{1}H-NMR - Spektrums, die die Struktur der Verbindung als 10-Acetoxy-8-hydroxy-9-isobutyryloxy-thymol belegen, sind in Tab. 13 aufgeführt.
Dieses Thymolderivat ist unseres Wissens bisher noch nicht in der Natur gefunden worden.

5. Isolierung und Charakterisierung der Substanz E

Bei der sc Auftrennung des Blütenextraktes mit Petrolether/Ether - Gemischen kristallisierte aus den Fraktionen VII und VIII die hydroxamat - positive Substanz E aus (hR_f 37 in DC - System 6, s. Abb. 12, S. 38). Erneute SC des gelblichen Kristallisates lieferte 138 mg der dc einheitlichen, weißen, mikrokristallinen Verbindung (s. Exp. Teil, S. 121). Umkristallisationsversuche mit verschiedenen Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen nach verschiedenen Methoden mit dem Ziel größere Einkristalle zu erhalten, waren erfolglos. Die Verbindung schmilzt bei 186°C. Das UV - Spektrum zeigt

ein Absorptionsmaximum bei 283 nm (ϵ = 7114; Schulter bei 289 nm), dessen Lage für das Vorliegen eines Phenols spricht (SCOTT, 1964; SENDRA u. CUÑAT, 1980). Aus der CH - Analyse ergibt sich in Verbindung mit dem Molekülpeak des Massenspektrums (M^+ = 340; s. Abb. 27) die Summenformel $C_{20}H_{20}O_5$. Die ersten Folgefragmente bei m/z 322 (M^+ - 18), 312 (M^+ - 28) und 311 (M^+ - 29) deuten auf die Abspaltung einer freien Hydroxylgruppe als Wasser hin, bzw. auf die Abspaltung einer C_2H_4- oder CO - Gruppe und einer C_2H_5- oder CHO - Gruppe. Weitere Spaltprodukte bei m/z 293, 283 und 265 lassen sich durch Abspaltung dieser Fragmente aus den ersten Folgefragmenten erklären, wobei die Reihenfolge variabel zu sein scheint. Fragmentpeaks bei m/z 91 und 65 sowie 105, 77 und 51 weisen auf einen alkylierten Aromaten

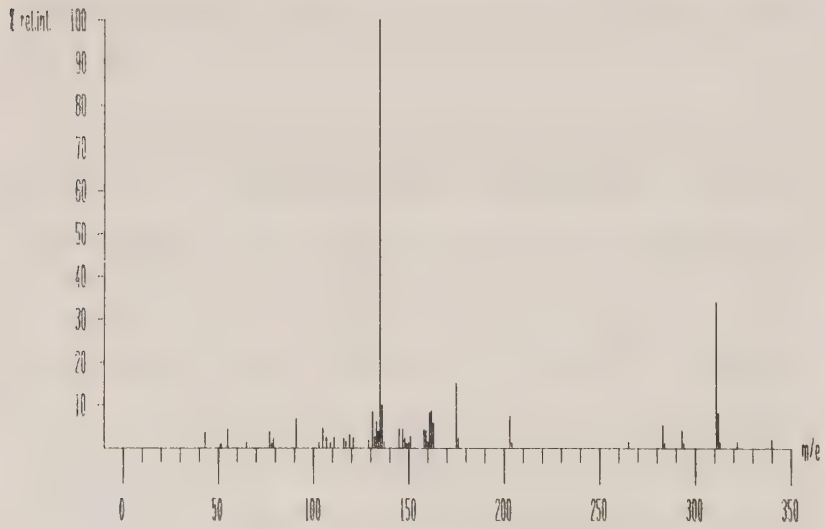


Abbildung 27: Massenspektrum von Substanz E

bzw. ein Phenylderivat hin (HESSE u. Mitarb., 1979). Den Basispeak bildet das Fragment mit der Masse m/z 135.
Das IR - Spektrum (s. Abb. 28) zeigt deutliche Aromatenbanden bei 3020, 1615, 1595 und 1505 cm^{-1}. Die Banden bei 860 und 810 sowie 800 cm^{-1} lassen eine 1,4-Di- bzw. 1,3,4-Trisubstitution des Aromaten vermuten. Signale bei 2860 und 1430 cm^{-1} deuten auf das Vorliegen einer Methylgruppe hin (HESSE u. Mitarb., 1979; vgl. auch Substanz D und F). Bei 3420 und 3335 cm^{-1} erscheinen zwei Signale für freie Hydroxylgruppen. Die Verbindung läßt sich acetylieren, wobei das Acetat (Schmp.: 199 - 202°C) im Massenspektrum den Molekülpeak bei m/z 424 zeigt. Danach liegen in der Verbindung zwei acetylierbare freie OH - Gruppen vor.
Das ^{1}H-NMR - Spektrum (80 MHz; Abb. 29, S. 70) zeigt, daß die Verbindung zwei 1,3,4-trisubstituierte Aromaten enthält. Ein Singulett bei 2,28 ppm für sechs Protonen ist zwei äquivalenten Methylgruppen zuzuordnen, die aufgrund ihrer Tieffeldverschiebung am Aromaten lokalisiert sein

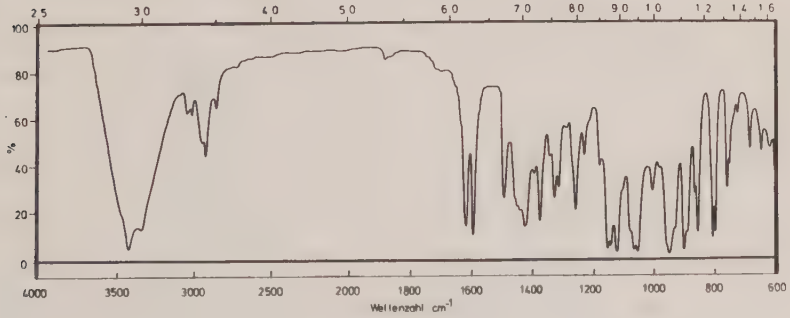


Abbildung 28: IR - Spektrum von Substanz E

sollten. Die im Bereich von 7,32 bis 7,25 ppm und bei 5,90 ppm auftretenden Signale werden von zwei OH - Gruppen hervorgerufen, da diese nach H/D - Austausch mit D_2O nicht mehr beobachtet werden können.

Im 360 MHz ^{1}H-NMR - Spektrum des Acetylderivates (s. Abb. 30, S. 72) erscheinen erwartungsgemäß die Signale für zwei Acetylgruppen bei δ = 2,070 und 1,930 ppm. Die Protonen der beiden Methylgruppen zeigen sich hier als getrennte Signale bei δ = 2,353 und 2,345 ppm. Durch Einstrahlungsversuche lassen sich ihre vermutete Stellung an Aromaten verifizieren und die Protonen der beiden 1,3,4-trisubstituierten Aromaten lokalisieren.

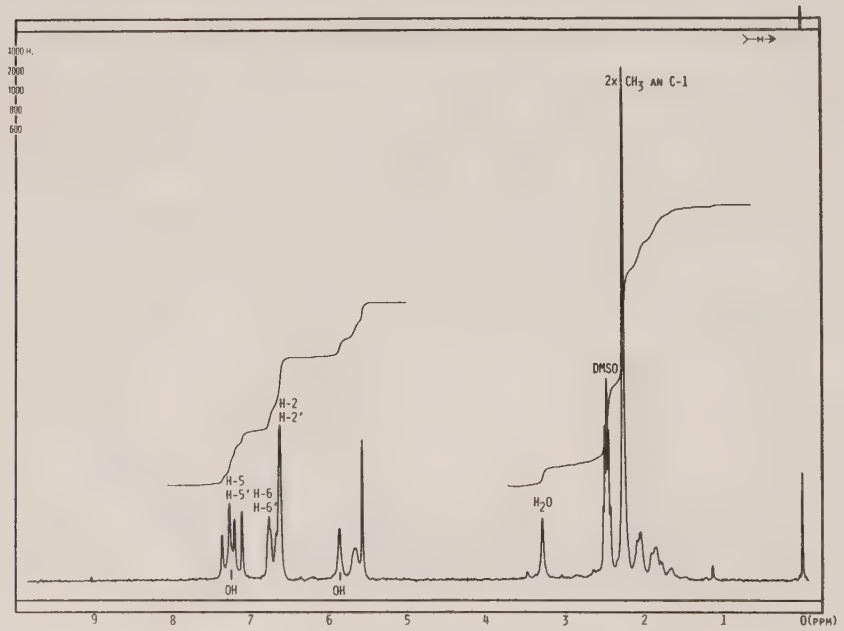


Abbildung 29: 80 MHz ^{1}H-NMR - Spektrum von Substanz E in DMSO-d_6

Nach Einstrahlung auf die Resonanzfrequenzen der Methylgruppen vereinfachen sich die Signale der beiden Protonen bei δ = 6,868 und 6,811 ppm von zwei breiten, in den Spitzen mehrfach aufgespaltenen Dubletts zu zwei scharfen Doppeldubletts. Aus diesen können die Kopplungskonstanten für zwei meta-ständige Protonenpaare mit J = 1,5 Hz und die für zwei ortho-ständige mit J = 7,7 bzw. 7,9 Hz entnommen werden. Es sollte sich somit um die Signale der Protonen H-6' und H-6 handeln (s. Abb. 31). Gleichzeitig erfolgt bei dieser Einstrahlung auch eine Vereinfachung der beiden breiten, ebenfalls in den Spitzen mehrfach aufgespaltenen Singuletts bei δ = 6,778 und 6,718 ppm zu zwei Doppeldubletts mit den Kopplungskonstanten J = 1,5 Hz und J = < 1 Hz. Danach handelt es sich um die Signale der beiden Protonen H-2' und H-2, bei denen die größere Kopplungskonstante aus der Kopplung mit den meta-ständigen Protonen H-6' und H-6 resultiert und die kleinere aus der mit den para-ständigen H-5' und H-5. Die kleine Kopplung (J = < 1 Hz) kann in den beiden Signalen bei δ = 7,426 und 7,397 ppm für H-5 und H-5' wiedergefunden werden.
Da sich bei diesem Einstrahlungsversuch auf die Signale der Methylgruppen die Protonen H-2, H-2', H-6 und H-6' verändern, müssen diese an C-1 und C-1' lokalisiert sein. Die beobachtete Vereinfachung der Signale kann durch den Wegfall der Kopplungen H-2/CH_3 bzw. H-2'/CH_3' und H-6/CH_3 bzw. H-6'/CH_3' erklärt werden. Das Auftreten dieser unter 1 Hz liegenden Kopplungen und der ebenfalls in diesem Bereich liegenden para - Kopplungen zwischen H-2 und H-5 bzw. H-2'

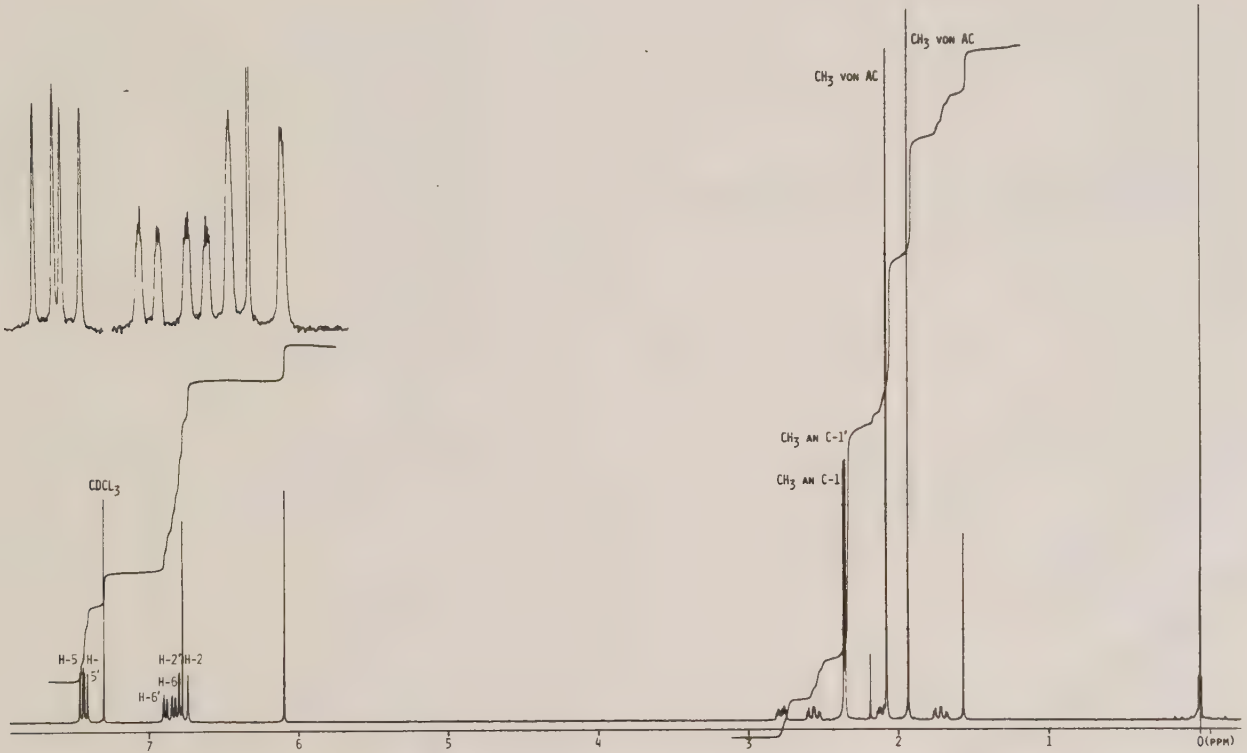


Abbildung 30: ^{1}H-NMR - Spektrum des Acetylderivates von Substanz E in $CDCl_3$

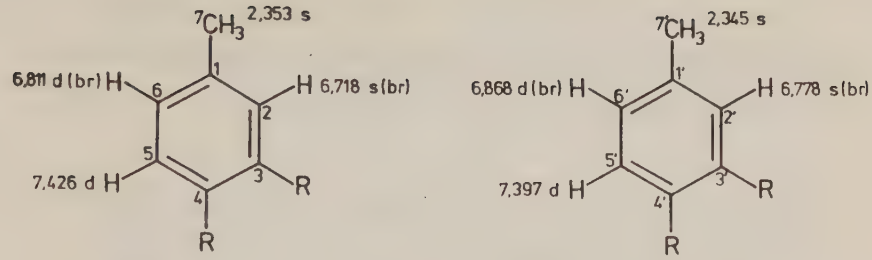


Abbildung 31: Zwei 1,3,4-trisubstituierte Aromaten als Strukturelemente des Acetylderivates von Substanz E

und H-5' bewirken die starken Aufspaltungen der Spitzen und die Verbreiterungen der Dubletts von H-6 und H-6' sowie der Singuletts von H-2 und H-2'.

Einstrahlung auf die Resonanzfrequenz von H-2 bei δ = 6,718 ppm ergibt für das Proton bei δ = 6,811 ppm ein schärferes Dublett mit der Kopplungskonstante J = 7,9 Hz, die in dem Dublett bei δ = 7,426 ppm wiederzufinden ist. Zusätzlich geht die leichte Verbreiterung der Spitze des Singuletts bei δ = 2,353 ppm verloren, während das Singulett für die zweite Methylgruppe bei δ = 2,345 ppm in der Spitze leicht verbreitert bleibt. Es ergibt sich somit für die Protonen der beiden Aromaten die in Abb. 31 angegebene Zuordnung. Eine über die in Abb. 31 wiedergegebenen Strukturelemente hinausgehende Strukturaufklärung der Verbindung gelang nicht, da die ^{1}H-NMR- und ^{13}C-NMR - Daten im weiteren Bereich nicht eindeutig korreliert werden konnten. Eine Verbindung mit der Summenformel $C_{20}H_{20}O_5$, die diese beiden

Strukturelemente enthält und darüberhinaus zwei freie OH - Gruppen führt, konnte in der Literatur nicht gefunden werden, sodaß es sich hierbei um einen neuen Naturstoff handeln sollte.

IV. Wahrscheinliche Ursache des Fehlens von Sesquiterpenlactonen in den Blütenkörbchen von A. sachalinensis

Unter den bisher auf ihre Sl - Führung untersuchten Arnica - Arten (s. Tab. 1, S. 6 und 7) ist A. sachalinensis die erste, in der keine Sl nachgewiesen werden konnten. Untersuchungen an verschiedenen Asteraceen haben gezeigt, daß die Sl hier in den Drüsenhaaren akkumuliert werden (FAUST u. JONES, 1973; PADOLINA, 1973; MIELKE, 1975; RODRIGUEZ u. Mitarb., 1976; KELSEY u. SHAFIZADEH, 1980). Nach WILLUHN (1972a) soll A. sachalinensis keine Drüsenhaare besitzen, so daß hier der Grund für das Fehlen von Sl zu suchen sein könnte. Eine mikroskopische Überprüfung der Angaben von WILLUHN an der zur Untersuchung herangezogenen A. sachalinensis ergab, daß diese im Gegensatz zu A. montana und den anderen Sl-führenden Arnica - Arten weder an Blättern, Stengeln noch Blütenkörbchen Drüsenhaare besitzt. Die Abbildungen 32 bis 40 zeigen die Behaarung der äußeren Seiten des Blütenstandsbodens, der Hüllkelchblätter, des Fruchtknotens und der Corolle der Zungenblüten jeweils im Vergleich zu A. montana. Während bei der letzten jeweils neben den bekannten Gliederhaaren die typischen Asteraceen - Drüsenhaare auftreten, fehlen diese bei A. sachalinensis vollständig. Statt dessen wurden in den Blütenkörbchen, beson-

ders zahlreich im Blütenstandsboden (s. Abb. 40), sowie in den Blättern und Stengeln Exkretbehälter gefunden. Diese erklären den im Vergleich zu anderen untersuchten Arnica - Arten gefundenen hohen Gehalt an ätherischem Öl in diesen Organen (WILLUHN, 1972a).

Um zu überprüfen, ob auch bei der Gattung Arnica die Sl in den Drüsenhaaren abgelagert werden, wurden diese in Anlehnung an RODRIGUEZ u. Mitarb. (1976) und KELSEY u. SHAFIZADEH (1980) von den Seiten des Blütenstandsboden vorsichtig abgeschabt und mit Chloroform extrahiert. Im Rückstand konnten dc nach Detektion mit ZIMMERMANN - Reagenz die bekannten Sl der A. montana - Blüten nachgewiesen werden, so daß sie auch hier in den Drüsenhaaren abgelagert sind.

Das Fehlen der Sl bei A. sachalinensis kann so auf das Nichtvorhandensein der entsprechenden Akkumulationsorte zurückgeführt werden.

Behaarung der äußeren Seiten der Blütenstandsböden

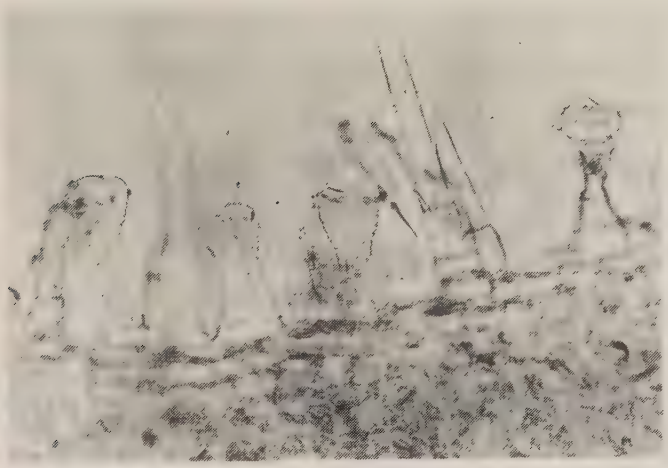


Abbildung 32: A. montana

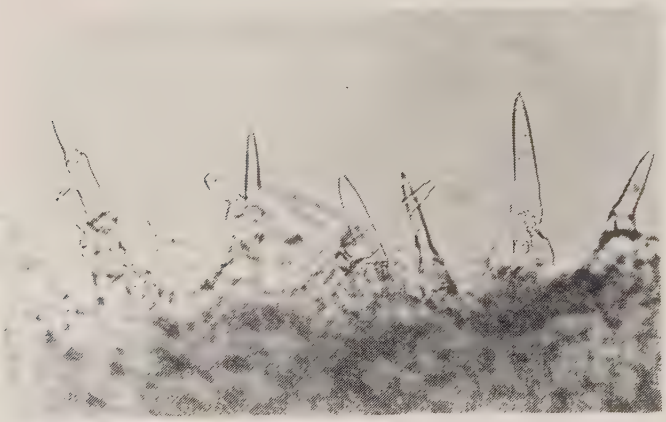


Abbildung 33: A. sachalinensis

Behaarung der Hüllkelchblätter

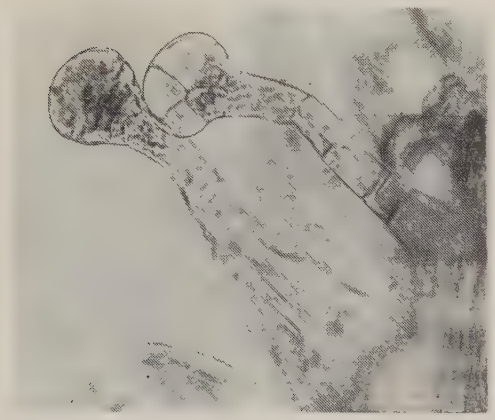


Abbildung 34: A. montana

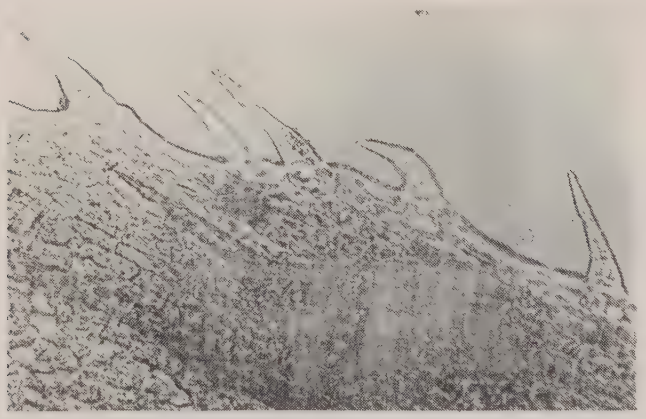


Abbildung 35: A. sachalinensis

Behaarung der Fruchtknoten

Abbildung 36: A. montana

Abbildung 37: A. sachalinensis

Behaarung der Corollblätter der Zungenblüten

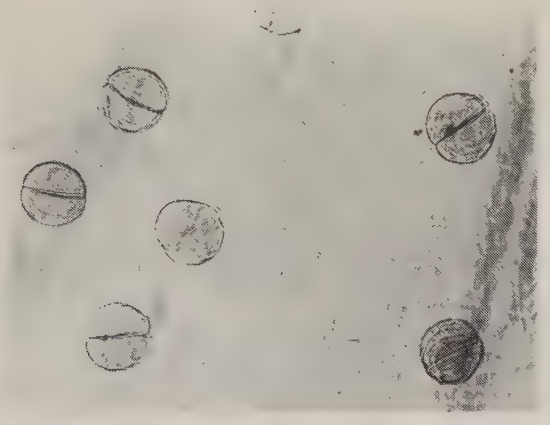


Abbildung 38: A. montana

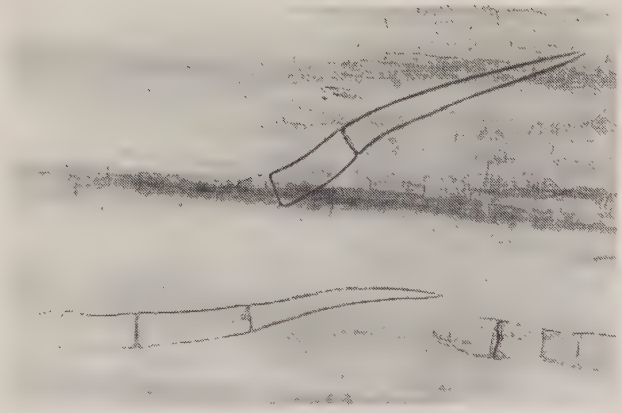


Abbildung 39: A. sachalinensis

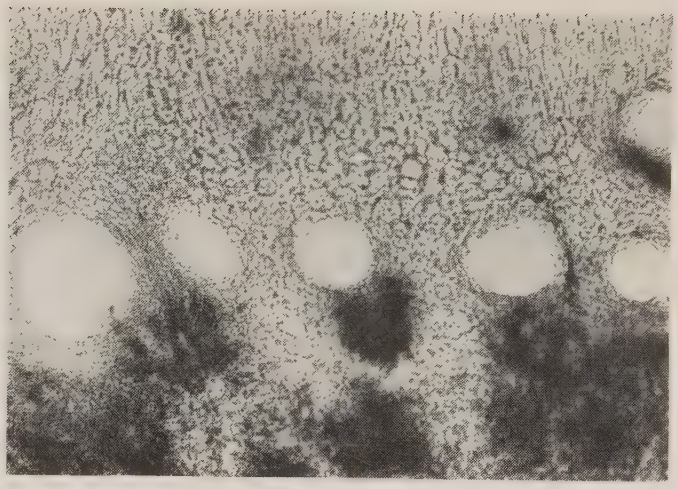


Abbildung 40: Exkretbehälter im unteren Teil des Blütenstandsboden von A. sachalinensis (Durchmesser 130 - 280 µm)

D. Diskussion

Während in A. montana neben Helenalin-, 11,13-Dihydrohelenalin- und Tetrahydrohelenalinestern auch die freien Verbindungen nachgewiesen werden konnten, sind in A. chamissonis bisher nur veresterte bzw. partialveresterte Pseudoguaianolide gefunden worden (s. Tab. 1, S. 6 und 7). Vermuclich wurden die nicht veresterten Vorstufen wegen des lipophilen Extraktionsverfahrens, das bei diesen Untersuchungen gewählt wurde, nicht miterfaßt. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb geklärt werden, ob in den Blütenkörbchen der Unterart genuina von A. chamissonis neben den beiden dominierenden Sesquiterpenlactonen Chamissonolid und 6-Desoxychamissonolid (WILLUHN u. Mitarb., 1981) auch die entsprechenden Desacetylverbindungen vorkommen. Beide Verbindungen sind bisher nicht in der Gattung Arnica gefunden worden.

Die Aufarbeitung des Ethanolextraktes führte zur Isolierung von zwei hydrophileren Sesquiterpenlactonen, deren Struktur durch spektroskopische Methoden und Derivatisierung ermittelt wurde. Bei einer der Verbindungen handelt es sich um 2-Desacetyl-6-desoxychamissonolid, das mit dem von YANAGITA u. Mitarb. (1970a,b) beschriebenen Neopulchellin identisch ist (s. auch INAYAMA u. Mitarb., 1973). Diese Verbindung wurde bisher nur in der Asteraceae Gaillardia pulchella Foug. (Tribus Helenieae) gefunden. Bei der zweiten Verbindung handelte es sich um das vermutete 2-Desacetylchamissonolid, dessen Vorkommen in der Natur bisher noch nicht beschrieben worden ist. Beide Verbindungen kommen in

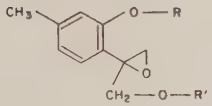
der Droge lediglich in Spuren vor.
Als weitere, bisher in den Blüten dieser Unterart noch nicht nachgewiesene Sesquiterpenlactone wurden 11,13-Dihydrohelenalin und 4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid isoliert, die hier ebenfalls nur in geringerer Konzentration vorliegen. Bei 4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid handelt es sich um das in den Blüten der Unterarten foliosa und incana von A. chamissonis dominierende Pseudoguaianolid (WILLUHN u. KRESKEN, 1981). Insgesamt sind damit bisher neun Sesquiterpenlactone in den Blütenkörbchen von A. chamissonis ssp. genuina identifiziert worden.
Mit A. sachalinensis wurde in dieser Untersuchung erstmals die Sesquiterpenlactonführung einer Arnica - Art aus dem Subgenus Andropurpurea (MAGUIRE, 1943) analysiert. Zur allgemeinen Oberraschung konnten in den Blütenkörbchen dieser Art keine Sesquiterpenlactone nachgewiesen werden. Ein weiterer bereits bekannter Unterschied zu den anderen bisher untersuchten Arnica - Arten ist der besonders hohe Gehalt an ätherischem Öl in den Blütenkörbchen dieser Art, was nach GONTZEL u. Mitarb. (1967) auf ihren großen Drüsenreichtum zurückgeführt wird. Nach WILLUHN (1972a) andererseits sollen die Blütenkörbchen keine Drüsenhaare besitzen. Eine daraufhin vorgenommene mikroskopische Analyse der aufgearbeiteten Droge ergab, daß diese abweichend von den bisher untersuchten sesquiterpenlacton-führenden Arnica - Arten tatsächlich keine Drüsenhaare besitzt, sondern zahlreiche Exkretbehälter, wie sie für die unterirdischen Organe charakteristisch sind.

In der Literatur finden sich verschiedentlich Hinweise, daß Sesquiterpenlactone bei Asteraceen in den Drüsenhaaren akkumuliert werden (WEBER u. DEUFEL, 1951; STAHL, 1952 und 1957; SHIELDS, 1952; FAUST u. JONES, 1973; PADOLINA, 1973; MIELKE, 1975; RODRIGUEZ u. Mitarb., 1976; HEGNAUER, 1977; KELSEY u. SHAFIZADEH, 1980). Durch Abschaben der Drüsenhaare von A. montana - Blütenkörbchen und deren Extraktion konnte gezeigt werden, daß auch hier die Sesquiterpenlactone in den Drüsenhaaren abgelagert werden. Die Ursache für das Fehlen von Sesquiterpenlactonen bei A. sachalinensis dürfte somit im Nichtvorhandensein der notwendigen Akkumulationsorte für diese Verbindungen zu suchen sein. Eine ähnliche Beobachtung wurde von FAUST u. JONES (1973) und PADOLINA (1973) innerhalb der Gattung Vernonia gemacht. Auch hier besitzen alle sesquiterpenlacton-führenden Arten Drüsenhaare, während in Vernonia flaccidifolia keine Drüsenhaare und auch keine Sesquiterpenlactone nachgewiesen werden konnten (s. auch BURNETT u. Mitarb., 1974). Es wäre wünschenswert zu prüfen, ob es sich hierbei um ein allgemein gültiges Phänomen handelt. Darüber hinaus wäre es denkbar, daß auch die drüsenhaarfreien Arten grundsätzlich Sesquiterpenlactone synthetisieren können, diese jedoch lediglich wegen fehlender Akkumulationsorte in der Pflanze nicht gespeichert werden können. Dies wäre dann ein weiteres Beispiel dafür, daß für das Vorhandensein von Sekundärstoffen in Pflanzen nicht allein die Biosynthesemöglichkeit, sondern parallel dazu auch die Fähigkeit zu ihrer Akkumulation notwendig ist (HEGNAUER, 1963, 1965, 1969).

Als Hauptkomponenten des Blütenextraktes wurden stattdessen Thymolderivate isoliert und identifiziert. Es sind dieses Thymol, Thymolisobutyrat, 10-Acetoxy-8,9-epoxy-thymol-isobutyrat und 10-Acetoxy-8-hydroxy-9-isobutyryloxy-thymol. Eine weitere, als Strukturelemente zwei 1,3,4-trisubstituierte Aromaten enthaltene neue Verbindung mit der Summenformel $C_{20}H_{20}O_5$ konnte nicht identifiziert werden.
Thymol wurde bereits im ätherischen Öl der unterirdischen Organe und Blütenkörbchen von A. sachalinensis und weiterer Arnica - Arten gefunden (WILLUHN, 1972b,c; SCHULTE u. Mitarb., 1963; SCHULTE u. RÖCKER, 1966; BRUNNER, 1969; JARUSZESKI u. Mitarb., 1970; KATING u. Mitarb., 1973; SCHMITZ u. KATING, 1977).
Thymolisobutyrat bildet die Hauptkomponente im ätherischen Öl von A. sachalinensis (WILLUHN, 1972c) und wurde in unterschiedlichen Konzentrationen auch im ätherischen Öl der unterirdischen Organe und Blütenkörbchen anderer Arnica - Arten identifiziert (RINN, 1970; WILLUHN, 1972c; KATING u. Mitarb., 1973; SCHMITZ u. KATING, 1977). Nach SCHMITZ u. KATING (1977) nimmt sein Gehalt bei der Lagerung der Droge ab unter gleichzeitigem Anstieg des Thymolgehaltes.
Die beiden Diesterderivate wurden dagegen erstmals aus einer Arnica - Art isoliert. Ein ähnlich gebautes Thymolderivat, das 8,9-Epoxy-10-isobutyryloxy-thymol-isobutyrat konnte von BOHLMANN u. ZDERO (1972) aus dem Wurzelextrakt von A. amplexicaulis identifiziert werden. Die hier isolierte entsprechende 10-Acetoxy - Verbindung kommt in der Asteraceae Wedelia forsteriana (Tribus Heliantheae) vor

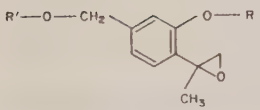
(BOHLMANN u. ZDERO, 1976). Bei dem 10-Acetoxy-8-hydroxy-9-isobutyryloxy-thymol handelt es sich dagegen um ein erstmals isoliertes Thymolderivat.

Innerhalb der Familie der Asteraceen sind derartige Diesterderivate des Thymols relativ weit verbreitet (BOHLMANN u. ZDERO, 1977). Abbildung 41 gibt die bisher beobachteten Derivatisierungsmöglichkeiten von Thymol in dieser Familie wieder. Neben Isobuttersäure und 2-Methylbuttersäure wurden seltener auch Essigsäure, Methacrylsäure, Isovaleriansäure,



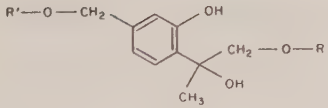
(1a) R = R' = Isobutyryl

(1b) R = Isobutyryl, R' = 2-Methylbutyryl



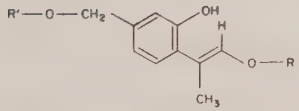
(2a) R = R' = Isobutyryl

(2b) R = Isobutyryl, R' = 2-Methylbutyryl



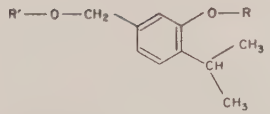
(3a) R = R' = Isobutyryl

(3b) R = Isobutyryl, R' = 2-Methylbutyryl



(4a) R = R' = Isobutyryl

(4b) R = Isobutyryl, R' = 2-Methylbutyryl

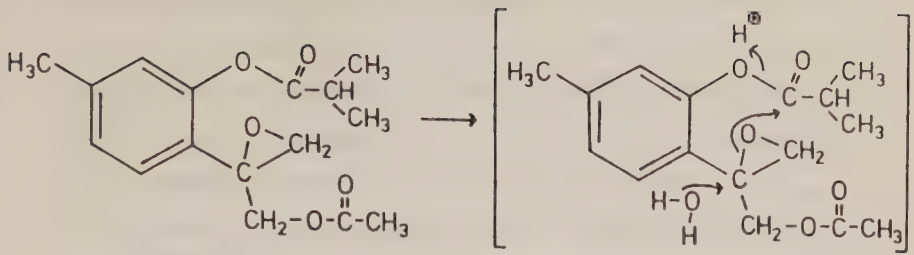


(5a) R = R' = Isobutyryl

(5b) R = Isobutyryl, R' = 2-Methylbutyryl

Abbildung 41: Derivatisierungsmöglichkeiten von Thymol innerhalb der Familie der Asteraceen (nach BOHM, 1977)

Angelicasäure, Tiglinsäure, Benzoesäure und Zimtsäure als Säurekomponenten gefunden. Diese Verbindungen werden in den meisten der dreizehn Triben beobachtet (HEYWOOD u. Mitarb., 1977), doch sind sie nach HEGNAUER (1977) bevorzugt in den Triben Eupatorieae, Inuleae und Helenieae anzutreffen. Innerhalb des Tribus Senecioneae wurde diese Substanzgruppe nur in den Gattungen Doronicum (BOHLMANN u. Mitarb., 1980) und Neurolaena (BOHLMANN u. Mitarb., 1979) gefunden, die beide in Beziehung zur Gattung Arnica stehen. Die Eingruppierung dieser drei Gattungen in den Tribus Senecioneae ist umstritten (HEROUT, 1971; BOHLMANN u. ZDERO, 1972; SEIGLER u. Mitarb., 1974; NORDENSTAM, 1977; ROBINS, 1977). Nicht auszuschließen ist, daß das isolierte und bisher nicht gefundene, an C-9 und C-10 veresterte 8,9,10-Trihydroxy-thymol-derivat während der Lagerung und Aufarbeitung aus 10-Acetoxy-8,9-epoxy-thymol-isobutyrat (Substanz D) hervorgehen kann, wie dies in Abbildung 42 wiedergegeben ist. Eine derartige durch Protonierung des Phenolacylrestes, Öffnung des Epoxidringes und trans-Acylierung des Isobutyrylrestes entstehende Umlagerung ist von BOHLMANN u. Mitarb. (1969) bei Hydrolyse ähnlicher 8,9-Epoxy-thymol-isobutyrate mit verdünnter Säure beobachtet worden. Doch konnten die Autoren die dabei entstehenden Verbindungen auch als Naturstoffe isolieren. Das isolierte 8,9,10-Trihydroxy-thymolderivat konnte auch nach Kaltauszug der frischen A. sachalinensis - Blüten mit Petrolether, Benzol oder Methanol eindeutig nachgewiesen werden, so daß es sich bei ihm um einen echten Pflanzeninhaltsstoff handelt. Die beiden neuen Thymolderivate sind



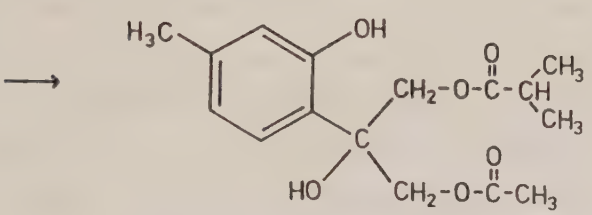


Abbildung 42: Mögliche Bildung des an C-9 und C-10 veresterten 8,9,10-Trihydroxy-thymolderivates (Substanz F) aus dem 8,9-Epoxy-thymolderivat (Substanz D)

auch Bestandteile des ätherischen Öles, wobei das 8,9-Epoxy-thymol-derivat neben Thymolisobutyrat eine weitere Hauptkomponente darstellt.

Schließlich wurde aus den Blütenkörbchen von A. sachalinensis mit 6-Acetyl-2,2-dimethyl-2H-chromen (= Desmethoxyencecalin = Substanz C) erstmals ein Chromenderivat aus der Gattung Arnica isoliert. Das Vorkommen dieser Verbindungsklasse innerhalb der Asteraceen ist nach HEYWOOD u. Mitarb. (1977) nur auf wenige Triben beschränkt. HEGNAUER

(1977) gibt für ihr Vorkommen lediglich die Triben Eupatorieae und Heliantheae an (vgl. u.a. BJELDANES u. GEISSMAN, 1969; ANTHONSEN, 1969; TAYLOR u. WRIGHT, 1971; BOHLMANN u. Mitarb., 1981b,f). In diesen beiden Triben wurde auch die von uns isolierte Verbindung wiederholt gefunden (Eupatorieae; u.a. BOHLMANN u. Mitarb., 1977a,c, 1978b, 1981a; Heliantheae: u.a. BOHLMANN u. GRENZ, 1970, 1977; BOHLMANN u. LONITZ, 1978; BOHLMANN u. JAKUPOVIC, 1979; BOHLMANN u. Mitarb., 1981c,d, 1982). In Einzelfällen tritt Substanz C auch in den Triben Inuleae (BOHLMANN u. Mitarb., 1978a), Helenieae (BOHLMANN u. ŻDERO, 1979) und Astereae (BOHLMANN u. Mitarb., 1981e) auf. In Pflanzen des Tribus Senecioneae dagegen konnten bisher keine Chromenderivate nachgewiesen werden. Lediglich p-Hydroxyacetophenon - Derivate vom Typ des Euparins sind bekannt (BOHLMANN u. Mitarb., 1977b). Die Isolierung des Chromenderivates aus A. sachalinensis unterstützt das von HEROUT (1971), BOHLMANN u. ZDERO (1972), SEIGLER u. Mitarb. (1974) und ROBINS (1977) diskutierte Vorhaben, die Gattung Arnica aus dem Tribus Senecioneae zu entfernen und den Heliantheae (incl. Helenieae) zuzuordnen. Dieses Ergebnis ist somit ein weiterer Beitrag zu der Frage, ob die Gattung Arnica botanisch richtig eingeordnet ist. Für eine Entscheidung, ob das Vorkommen von Chromenderivaten für die systematische Einordnung in der Gattung Arnica von chemotaxonomischen Interesse ist, wären weitere Untersuchungen an anderen Arnica - Arten wünschenswert.

Da A. sachalinensis zu dem chemisch bisher nicht untersuchten Subgenus Andropurpurea zählt, stellt sich die Frage, ob diese Inhaltsstoffführung (Fehlen von Sesquiterpenlactonen, Auftreten von Chromenderivaten) subgenus- oder nur artspezifisch ist. Zur Klärung dieses Sachverhaltes sollte eine Untersuchung der beiden anderen zum Subgenus Andropurpurea gehörenden Arnica - Arten, A. unalaschcensis und A. lessingii, angestrebt werden.

E. Zusammenfassung

1. Die Blütenkörbchen der nordamerikanischen Wiesenarnika, Arnica chamissonis Less. ssp. genuina Maguire führen neben den beiden dominierenden Pseudoguaianoliden Chamissonolid und 6-Desoxychamissonolid in Spuren auch deren freie Alkohole.
2-Desacetylchamissonolid und 2-Desacetyl-6-desoxychamissonolid (= Neopulchellin) konnten isoliert und ihre Struktur durch spektroskopische Methoden und Derivatisierung ermittelt werden. Das Vorkommen von 2-Desacetylchamissonolid in der Natur ist bisher noch nicht beschrieben worden.

2. In Spuren führen die Blüten auch die Pseudoguaianolide 11,13-Dihydrohelenalin und 4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid, die nach Isolierung durch Schmelzpunkt, DC-, GC- und GC/MS - Analyse identifiziert wurden. Bei 4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid handelt es sich um das dominierende Sesquiterpenlacton aus den Blüten der Unterarten foliosa und incana in A. chamissonis. Insgesamt sind damit bisher neun Sesquiterpenlactone in den Blütenkörbchen von A. chamissonis ssp. genuina nachgewiesen worden.

3. Mit A. sachalinensis (Regl.) A. Gray wurde erstmals die Sesquiterpenlactonführung einer Arnica - Art aus dem Subgenus Andropurpurea analysiert. Auch nach Anwendung verschiedener Extraktionsverfahren konnte keine Verbindung aus dieser Stoffgruppe gewonnen werden. Nach der vorliegenden Untersuchung unterschei-

det sich somit diese Arnica - Art von den anderen bisher untersuchten Arten nicht nur durch den hohen Gehalt an ätherischem Öl in den Blütenkörbchen, sondern auch durch das Fehlen von Sesquiterpenlactonen. Nach neueren Arbeiten werden die Sesquiterpenlactone bei Asteraceen in den Drüsenhaaren akkumuliert, was in der vorliegenden Untersuchung auch für Arnica montana nachgewiesen werden konnte. Die mikroskopische Analyse von Arnica sachalinensis ergab, daß diese keine Drüsenhaare besitzt. Dies kann als Erklärung für das Fehlen von Sesquiterpenlactonen herangezogen werden.

4. Als Hauptinhaltsstoffe des Blütenextraktes wurden Thymol, Thymolisobutyrat, 10-Acetoxy-8,9-epoxy-thymol-isobutyrat und 10-Acetoxy-8-hydroxy-9-isobutyryloxy-thymol isoliert und durch spektroskopische Methoden identifiziert. Eine weitere, als Strukturelemente zwei 1,3,4-trisubstituierte Aromaten enthaltene neue Verbindung mit der Summenformel $C_{20}H_{20}O_5$ konnte nicht identifiziert werden. Die beiden Diester wurden erstmals in der Gattung Arnica nachgewiesen. Bei dem an C-9 und C-10 veresterten 8,9,10-Trihydroxy-thymol-derivat handelt es sich um einen neuen Naturstoff.

5. Die beiden neuen Diester des Thymols sind auch Bestandteile des ätherischen Öles, in dem 10-Acetoxy-8,9-epoxy-thymol-isobutyrat neben Thymolisobutyrat eine Hauptkomponente ist.

6. Erstmals in einer Arnica - Art wurde mit 6-Acetyl-2,2-dimethyl-2H-chromen (= Desmethoxy-encecalin) ein

Chromenderivat isoliert und durch spektroskopische Methoden identifiziert. Das bisher nicht bekannt gewesene Vorkommen von Chromenderivaten in der Gattung Arnica wird im Zusammenhang mit der systematischen Einordnung der Gattung Arnica diskutiert.

F. Experimenteller Teil

I. Spektroskopische Methoden

Die Aufnahme der UV - Spektren und die Bestimmung der molaren Extinktion erfolgte mit dem Spektralphotometer Typ DB-G der Fa. BECKMANN bei Zimmertemperatur in Methanol (Uvasol) oder Ethanol (Uvasol).

Die Infrarot - Spektren wurden mit dem Spektralphotometer 297 der Fa. PERKIN-ELMER in KBr - Preßlingen oder in Chloroform (Uvasol) aufgenommen.

Die Massenspektren wurden mit dem Massenspektrometer Typ VARIAN MAT C H 5 im Institut für Organische Chemie und dem Massenspektrometer Typ VARIAN MAT CH 7 A im Institut für Physiologische Chemie der Universität Düsseldorf aufgenommen*. Die Aufnahme erfolgte im Direkteinlaß oder unter GC/MS - Kopplung. Die Ionisationsspannung betrug jeweils 70 eV.

Die Messung der ^{1}H-NMR - Spektren erfolgte mit dem 80 MHz - Gerät VARIAN - Spektrometer CFT 20 (Insitut für Pharmazeutische Chemie der Universität Düsseldorf)** sowie mit dem

---

*Herrn Dr. G. Schmidtberg, Institut für Organische Chemie der Universität Düsseldof und Herrn Dr. U. Matthiesen, Institut für Physiologische Chemie der Universität Düsseldorf danke ich für die Aufnahme der Spektren.

**Herrn Dr. H. J. Hemmerling, Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Düsseldorf, danke ich für die Aufnahme der 80 MHz ^{1}H-NMR - Spektren und Herrn Dr. G. Wendisch, Zentralbereich Forschung und Entwicklung der Bayer AG., Leverkusen, für die der 360 MHz NMR - Spektren sowie für seine Hilfe bei der Interpretation.

360 MHz - Gerät WH-360 der Fa. BRUKER-PHYSIK**, das mit dem Rechner Aspect 2000 und einer interaktiven Disk in Verbindung stand. An diesem Gerät wurden auch die gepulsten Homoentkopplungen durchgeführt. Als Lösungsmittel diente, soweit nicht anders angegeben, Deuterochloroform. Interner Standard war Tetramethylsilan. Die ^{13}C-NMR - Spektren wurden bei 90,52 MHz unter Protonen - Rauschentkopplung und unter Bedingungen des "gated decoupling" ebenfalls am Spektrometer WH-360 gemessen.

II. Bestimmung der physikalischen Konstanten

Die Schmelzpunkte wurden mit dem Mikroskopheiztisch Typ 350 der Fa. LEITZ bestimmt. Die Werte sind unkorrigiert.

III. Chromatographische Methoden

1. Dünnschichtchromatographie

1.1. Analytische Dünnschichtchromatographie

Als Adsorbens dienten, soweit nichts anderes angegeben, Kieselgel 60 F_{254} - Fertigplatten der Fa. MERCK. Die Chromatographie wurde in der Regel über eine Laufstrecke von 10 cm bei Kammersättigung durchgeführt. Die Verhältnisangaben bei den Fließmitteln beziehen sich jeweils auf Volumenanteile.

1.2. Präparative Dünnschichtchromatographie

Zur präparativen Trennung geringer Substanzmengen bzw. deren Reinigung wurden Aluminium - Fertigplatten mit Kieselgel 60 F_{254} der Fa. MERCK verwendet. Pro Platte wurden ca. 8 mg Substanz mit dem DESAGA - Mikrodoser nach DIBBERN aufgetra-

gen. Nach Entwicklung der Platten wurden die entsprechenden Substanzzonen entweder durch Betrachtung der Platten in UV - Licht (254 nm) oder durch Herausschneiden einer Referenzspur und deren Detektion ermittelt. Die Elution der Substanzen vom Adsorbens erfolgte durch langsames Übertropfen eines Chloroform/Methanol - Gemisches (7/3) über die herausgeschnittenen Streifen. Das Elutionsgemisch wurde abgezogen, der Rückstand in wenig Lösungsmittel aufgenommen und zur Abtrennung letzter Adsorbenspartikel durch eine Filterspritze gegeben (DIBBERN u. Mitarb., 1971).

1.3. Fließmittel

System 1 : n-Pentan/Ether (32/68), (WILLUHN u. HERRMANN, 1973)

System 2 : Ether

System 3 : Ether/Ethylacetat (50/50)

System 4 : Ethylacetat

System 5 : Chloroform/Aceton (90/10)

System 6 : Benzol/Ether (80/20)

System 7 : Benzol

System 8 : n-Pentan/Ether (32/68) (Kammer mit Filtrierpapier-Auskleidung)

System 9 : Benzol/Ether (40/60)

System 10 : n-Pentan/Aceton (80/20)

System 11 : Benzol/Ethylacetat (90/10)

System 12 : Cyclohexan/Ether (85/15)

System 13 : Chloroform/n-Hexan (95/5)

System 14 : n-Pentan/Ether (50/50)

System 15 : n-Pentan/Ethylacetat (90/10)

1.4. Detektionsverfahren

a) Hydroxylamin/$FeCl_3$ (FEIGL u. Mitarb., 1934; STAHL, 1962)

A: 10 g Hydroxylaminhydrochlorid + 90 g H_2O

B: 20 g NaOH + 80 g H_2O

C: 2 g $FeCl_3$ + 20 ml HCl (37%) + 78 ml H_2O

Lösung A und B werden kurz vor dem Besprühen im Verhältnis 1 : 1 gemischt, die Platte mit dieser Lösung besprüht und 10 - 15 Min. lang bei 100 - 110°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird mit Lösung C besprüht. Die Sl, Thymol und seine Derivate sowie das Chromenderivat reagieren dabei unter Braunfärbung.

b) Anisaldehyd/H_2SO_4 (STAHL, 1962)

1 ml Anisaldehyd + 97 ml Essigsäure (99 - 100%) + 2 ml H_2SO_4 (95 - 97%)

Nach dem Besprühen wird bis zur Farbdifferenzierung bei 110°C erhitzt. Chamissonolide reagieren unter Braun-, Türkis- bzw. Violettfärbung, Helenalin und seine Derivate unter Gelbfärbung. Thymol und seine Derivate ergeben orangefarbene bzw. violette Reaktionsprodukte. Das Chromenderivat erscheint als orange-violetter Fleck.

c) ZIMMERMANN - Reagenz (NEHER, 1964)

A: 10 g 1,3-Dinitrobenzol + 90 ml Benzol

B: 6 g NaOH + 25 ml H_2O + 45 ml Methanol

Zunächst wird mit Lösung A besprüht, anschließend mit Lösung B. Helenalin und seine Derivate erscheinen blauviolett. Dihydrohelenalin, seine Derivate und das Chromenderivat rotviolett. Beim Liegenlassen der Platten verblassen die Farben mit der Zeit.

d) Vanillin/H_2SO_4 (STAHL, 1962)

1 g Vanillin + 100 ml H_2SO_4 (95 - 97%)

Nach dem Besprühen wird die DC - Platte bis zur optimalen Farbintensität 5 - 10 Min. lang auf 120°C erhitzt.

e) 2,4-Dinitrophenylhydrazin (STAHL, 1962)

0,1 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin + 100 ml 96%igem Ethanol + 1 ml HCl (37%)

Das Chromenderivat erscheint nach einiger Zeit als gelb bis orange gefärbtes Hydrazon.

f) Echtblausalz B

Frisch bereitete 0,5%ige wäßrige Echtblausalz B - Lösung

Dieses Reagenz dient zum Nachweis von phenolischen Verbindungen. Thymol und Substanz A erscheinen kurze Zeit nach dem Besprühen als gelb-orange farbene Flecke.

g) Pikrinsäure (FIORITI u. SIMS, 1968)

0,05 M Pikrinsäure in Ethanol (95%ig)

Lösung 1: Ether/Ethanol (95%)/Essigsäure (99 - 100%) (80/20/1)

Lösung 2: Ammoniak (25%)

Nach Besprühen mit der Pikrinsäure - Lösung wird die DC - Platte für 30 Min. in einer Kammer den Dämpfen von Lösung 1 ausgesetzt, im Anschluß daran für 2 Min. den Dämpfen von Lösung 2.

Epoxide wie z.B. Substanz B ergeben gelb-orange gefärbte Reaktionsprodukte auf gelbem Grund.

h) $NaOH/FeCl_3$

A: 20% NaOH in H_2O

B: 5% $FeCl_3$ in H_2O

Zunächst wird mit Lösung A besprüht, nach dem Trocknen (5 Min. bei 100°C) mit Lösung B. Phenolische Verbindungen reagieren mit $FeCl_3$ unter Bildung braun-gelb gefärbter Reaktionsprodukte.

2. Säulenchromatographie

Als Adsorbentien wurden Kieselgel 60 (70 - 230 mesh; MERCK) und neutrales Aluminiumoxid, Alumina WOELM N Super I, verwendet. Die Säulenfüllung erfolgte durch Einschlämmen des Adsorbens in das Elutionsmittel. Das zu trennende Substanzgemisch wurde entweder in wenig Elutionsmittel gelöst direkt oder am Trägermaterial adsorbiert (1 : 2) trocken auf die Säule gegeben. Die Oberfläche wurde mit Adsorbens und Seesand abgedeckt.

3. Gaschromatographie

Verwendet wurde der Gaschromatograph F 22 mit dem Schreiber Typ 56 der Fa. PERKIN-ELMER, der Gaschromatograph Typ 5710 A mit dem Schreiber 7123 A der Fa. HEWLETT-PACKARD, beide mit Stickstoff als Trägergas sowie der Gaschromatograph 2700 der Fa. VARIAN mit dem Schreiber VARIAN A 25 und Helium als Trägergas. Die drei Geräte waren mit einem Flammenionisationsdetektor ausgerüstet. Der Papiervorschub betrug jeweils 1 cm / Min.

3.1. GC der Sesquiterpenlactone

System 1 : Glaskapillarsäule 25 m DUHT OV 101 (MACHEREY & NAGEL)
Temperaturprogramm : 180°C - 250°C
Anstiegrate : 10°C/Min.
Trägergas : Stickstoff 0,5 bar
Splitverhältnis : ca. 1 : 10
Injektor- und Detektortemperatur : 250°C bzw. 270°C

System 2 : Glaskapillarsäule 15 m OV 1 (MACHEREY & NAGEL)
Temperaturprogramm : 150°C - 250°C
Anstiegrate : 10°C/Min.
Trägergas : Helium 1 bar
Splitverhältnis : ca. 1 : 10
Injektor- und Detektortemperatur : 250°C bzw. 270°C

System 3 : Glaskapillarsäule 15 m OV 1
Säulentemperatur : 250°C isotherm
(weitere Daten s. System 2)

System 4 : Glaskapillarsäule 15 m OV 1
Temperaturprogramm : 180°C - 250°C
(weitere Daten s. System 2)

3.2. GC der Thymolderivate und des Chromenderivates

System 5 : Glaskapillarsäule 25 m DUHT OV 101
Temperaturprogramm : 120°C - 250°C
Anstiegrate : 10°C/Min.
(weitere Daten s. System 1)

Die GC - Analyse erfolgte weiterhin im System 1.

3.3. GC des ätherischen Öles von Arnica sachalinensis

System 6 : Glaskapillarsäule 25 m DUHT OV 1

Temperaturprogramm : 100°C - 115°C (2°C/Min.)

115°C : 4 Min. halten

115°C - 250°C (8°C/Min.)

(weitere Daten s. System 1)

System 7 : Glaskapillarsäule 12 m Carbowax 20 M

(MPI für Kohlenforschung; Mühlheim/Ruhr)

Temperaturprogramm : 100°C - 190°C

Anstiegrate : 4°C/Min.

(weitere Daten s. System 1)

3.4. GC der Estersäuren

System 8 : Glassäule (Fa. PACKARD) 2 m

3% Carbowax auf Chromosorb W, HP, 80 - 100 mesh

Temperaturprogramm : 100°C - 200°C

Anstiegrate: 8°C/Min.

Strömungsgeschwindigkeit : 100 ml N_2/Min.

Injektor- und Detektortemperatur : 250°C

4. Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Verwendet wurde das präparative HPLC - Gerät 830 der Fa. DU PONT mit dem UV - Spektrophotometer 837 und dem Schreiber Strip Chart Recorder 7130 A/B der Fa. HEWLETT-PACKARD. Die Elutionsgemische wurden über eine Filternutsche P 3 (durchschnittliche Porengröße 20 - 40 µm) gegeben und im Ultraschallbad entgast. Die jeweiligen Verhältnisangaben beziehen sich auf Volumenprozent. Vor Aufgabe der gelösten Teil-

fraktionen auf die Trennsäule wurden diese durch eine SARTORIUS - Filterspritze (Glasfaser - Vorfilter, Typ SM 13400) gegeben.

4.1. HPLC der Sesquiterpenlactone

Von den zu trennenden Teilfraktionen wurden 1%ige oder 5%ige Lösungen in Methanol hergestellt. Zur vollständigen Lösung war oft ein geringer Zusatz von Propanol-2 und/oder Methylenchlorid notwendig. Die Detektion erfolgte jeweils bei einer Wellenlänge von 220 nm. Der Papiervorschub betrug 0,25 cm/Min.

System I : Säule : Zorbax C-8 (Fa. DU PONT)
Länge : 25 cm; innerer Durchmesser : 9,4 mm
mobile Phase : H_2O/Methanol (6/4)
Fluß : 2,5 ml/Min.
Aufgabemenge pro Durchlauf : 100 µl der 1%igen Lösungen von Fraktion VII + VIII

System II : Säule : Zorbax C-8
mobile Phase : H_2O/Methanol (55/45)
Fluß : 1,75 ml/Min.
Aufgabemenge pro Durchlauf : 40 µl der 5%igen Lösung von Fraktion V

System III : wie System I, jedoch
Fluß : 3,25 ml/Min.

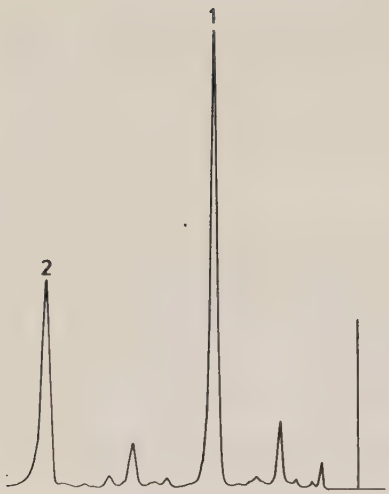


Abbildung 43:

HPLC - Trennung der Teilfraktion VII in System I

1 = 2-Desacetylchamissonolid (RT 18,8 Min.)

2 = 2-Desacetyl-6-desoxychamissonolid (RT 44,4 Min.)

Abbildung 44:

HPLC - Trennung der Hydrolyseprodukte von Chamissonolid in System III

1 = 2-Desacetylchamissonolid (RT 14,8 Min.)

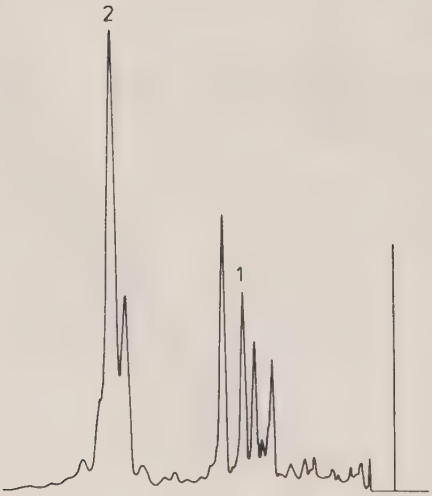


Abbildung 45:

HPLC - Trennung der Teilfraktion V in System II

1 = Dihydrohelenalin (RT 19,8 Min.)

2 = Chamissonolid (RT 36,8 Min.)

4.2. HPLC der Thymolderivate

Von den zu trennenden Teilfraktionen wurden 5%ige Lösungen in Chloroform hergestellt. Die Detektion erfolgte für Substanz F bei einer Wellenlänge von 276 nm und für Substanz D bei 254 nm. Der Papiervorschub betrug 0,25 cm/Min.

System IV : Säule : Zorbax - Sil 7 µm (Fa. DU PONT)
Länge : 25 cm; innerer Durchmesser : 2,12 cm
mobile Phase : Chloroform
Fluß : 50 bar
Aufgabemenge pro Durchlauf : 1,6 ml = ca. 80 mg
RT : Substanz D 13,8 Min., Substanz F 17,6 Min.

IV. Herkunft, Trocknung und Lagerung des Untersuchungsmaterials

1. A. chamissonis Less. ssp. genuina Maguire

Die Blütenkörbchen stammten von der var. interior (kleinblütige Pflanzen, Nr. 347), natürlicher Wuchsort Nähe Flugplatz Kodiak, Alaska/USA und der var. typica (großblütige Pflanzen, Nr. 348), natürlicher Wuchsort Kodiak, Alaska/USA, die sich dc in ihrer Sl - Führung nicht unterscheiden. Beide Varietäten wurden auf dem Versuchsfeld des Instituts für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität Gießen, Versuchsstation Rauischholzhausen, im Jahr 1980 kultiviert*. Die Trocknung der Blütenkörbchen

---

*Frau Prof. Dr. A. Vömel danke ich für den Anbau der Pflanzen, der mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft erfolgte.

erfolgte bei 40°C - 50°C im Umlufttrockenschrank. Bis zur Extraktion lagerte die Droge in pergamentierten Papiertüten bei -20°C.

2. A. sachalinensis (Regl.) A. Gray

Arnica sachalinensis (Regl.) A. Gray stammte aus dem Botan. Garten der Akademie der Wissenschaften Moskau (I-276). Sie wurde aus Früchten gezogen und auf dem Versuchsfeld des Institutes in Düsseldorf in den Jahren 1978 und 1979 kultiviert*. Die Blütenkörbchen wurden sofort nach der Ernte im Trockenschrank bei 40°C - 45°C getrocknet (Ernte: August bis Oktober). Bis zur Verwendung lagerten die getrockneten Drogen in pergamentierten Papiertüten.
Der hergestellte Petroletherextrakt wurde bis zur Aufarbeitung bei -20°C unter Stickstoff aufbewahrt.

V. Aufarbeitung der Blüten von A. chamissonis

1. Gewinnung der Sesquiterpenlactonfraktion

1137,8 g getrocknete und gemahlene Blütenkörbchen wurden im Soxhletverfahren mit 96%igem Ethanol erschöpfend extrahiert. Der Auszug wurde im Vakuum bis auf ca. 300 ml eingeengt, mit dem gleichen Volumen einer 2%igen Bleiacetatlösung versetzt und 24 Std. lang im Kühlschrank stehen

---

*Herrn Prof. Dr. W. Stubbe, Direktor des Botanischen Gartens der Universität Düsseldorf, danke ich für die Verfügungstellung des Versuchsgeländes und Herrn Reviergärtner W. Rogmann für den Anbau und die Pflege der Pflanzen.

gelassen. Der Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat mit Wasser auf ca. 900 ml ergänzt und 4 mal mit je 400 ml und dann 7 mal mit je 200 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die vereinigten Chloroformauszüge wurden bis zur Sirupdicke eingeengt und über Blaugel getrocknet. Es resultierten 18,53 g eines gelbgrünen, zähflüssigen Rückstandes. Dieser wurde in Anlehnung an HERRMANN (1978) in ca. 50 ml Chloroform gelöst und zur Reinigung über 1,2 kg Alumina WOELM N Super I mit einem Petrolether/Benzol/Chloroform/Methanol - Gemisch (5/4/1/2) filtriert. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 100 ml aufgefangen und nach DC - Kontrolle in System 1 und 3 zu zwei Sl - haltigen Fraktionen vereinigt.

aufgefangene Fraktionen	vereinigt zu Fraktion	Rückstand (g)	% vom Blütentrockengewicht
3 - 13	I	4,73	0,42
14 - 28	II	0,91	0,08

Fraktion I führte die Hauptmenge an Chamissonolid und 6-Desoxychamissonolid. Zu Fraktion II wurden diejenigen Teilfraktionen vereinigt, die im DC unterhalb von Chamissonolid aufgrund der Detektion mit Hydroxamat/$FeCl_3$ und Anisaldehyd/H_2SO_4 weitere Sl erwarten ließen (s. Abb. 3, S. 13).

2. Säulenchromatographische Auftrennung der Sl - Fraktion II

Die Sl - Fraktion II (0,91 g) wurde an 240 g Kieselgel 60 mit Ether sc aufgetrennt. Es wurden Fraktionen zu 15 ml aufgefangen, dc auf ihre Zusammensetzung untersucht und zu

8 Teilfraktionen vereinigt. Tabelle 14 gibt das Trennergebnis wieder.

Tabelle 14 : SC - Auftrennung der Sl - Fraktion II an Kieselgel 60 mit Ether; DC : System 4; Detektion : Hydroxylamin/ $FeCl_3$ und ZIMMERMANN - Reagenz

Teilfraktion	mg	Komponenten (hR_f)
I	11,5	4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid (95)
II	16,8	Helenalintiglinat (93)
III	120,5	6-Desoxychamissonolid (75), Chamissonolid (70), Helenalin (73)
IV	17,6	Chamissonolid
V	17,3	Chamissonolid, 11,13-Dihydrohelenalin (62)
VI	132,3	keine Sl
VII	51,8	2-Desacetyl-6-desoxychamissonolid (26), 2-Desacetylchamissonolid (24)
VIII	62,1	2-Desacetylchamissonolid

3. Acetylierung der Teilfraktionen VII und VIII

Jeweils 3 mg der Teilfraktionen VII und VIII wurden in 0,6 ml einer Mischung aus Acetanhydrid und frisch über Phosphorpentoxid destilliertem Pyridin (1/1) gelöst und 48 Std. lang bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß stehen gelassen. Das überschüssige Reagenz wurde im Trocknungsofen TO-50 (Fa. BÜCHI) bei 40°C über Phosphorpentoxid im Vakuum über

Tabelle 15 : hR_f - Werte der Chamissonolide in den Fließmittel - Systemen 1, 2, 4 und 5

Verbindung	Fließmittel - System 1	2	4	5
4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid	84	88	95	80
4,6-Di-O-acetylchamissonolid	n.b.	n.b.	90	68
6-Desoxychamissonolid	16	59	75	37
Chamissonolid	11	42	70	25
2-Desacetyl-6-desoxychamissonolid	3	11	26	n.b.
2-Desacetylchamissonolid	1	9	24	n.b.

Tabelle 16 : Retentionszeiten (Min.) der Chamissonolide in den GC - Systemen 1 - 3

Verbindung	GC - System 1	2	3
4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid	6,3	4,7	n.b.
4,6-Di-O-acetylchamissonolid	8,0	6,1	n.b.
6-Desoxychamissonolid	5,9	n.b.	n.b.
Chamissonolid	7,0	n.b.	n.b.
2-Desacetyl-6-desoxychamissonolid	5,3	n.b.	2,7
2-Desacetylchamissonolid	6,2	n.b.	3,2

Nacht abgezogen. Die acetylierten Fraktionen wurden unter Verwendung von Vergleichssubstanzen der DC-, GC- und GC/MS - Analyse zugeführt.

4. 2-Desacetyl-6-desoxychamissonolid (= Neopulchellin)

Teilfraktion VII (51,3 mg) wurde an 15 g Alumina WOELM N Super I mit Ethylacetat sc aufgetrennt. 2-Desacetylchamissonolid und 2-Desacetyl-6-desoxychamissonolid fielen dabei in einer gemeinsamen Fraktion an (16,1 mg). Durch präparative HPLC (System I) wurden beide Komponenten getrennt. Danach lagen 1,2 mg 2-Desacetyl-6-desoxychamissonolid und 2,4 mg 2-Desacetylchamissonolid gc einheitlich vor (s. Abb. 43, S. 102).

MS: m/z 266 (M^+, 3), 248 (9), 230 (23), 194 (45), 176 (21), 175 (25), 159 (23), 151 (21), 150 (31), 149 (35), 148 (22), 145 (27), 138 (41), 137 (27), 135 (26), 124 (67), 123 (33), 122 (23), 121 (58), 120 (28), 119 (52), 117 (22), 109 (85), 108 (58), 107 (86), 106 (40), 105 (48), 96 (23), 95 (92), 94 (100), 93 (72), 91 (20), 83 (23), 82 (25), 81 (66), 79 (60), 77 (28), 69 (28), 68 (25), 53 (38) (%)

Schmp.: 164 - 166°C

UV: λ_{max} 213 nm, Methanol

^{1}H-NMR - Daten s. Tab. 2 , S. 19 und Tab. 3 , S. 20

DC: hR_f - Werte s. Tab. 15, S. 107

GC: RT s. Tab. 16, S. 107

Nach Acetylierung war die Substanz nach DC-, GC- und GC/MS - Analyse identisch mit 4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid (Fragmente s. S. 111)

5. Gewinnung von 2-Desacetyl-6-desoxychamissonolid durch alkalische Hydrolyse von 6-Desoxychamissonolid

Die Hydrolyse von 6-Desoxychamissonolid erfolgte in Anlehnung an YANAGITA u. Mitarb. (1970b).

5 g KOH und 95 g Dioxan p.a. wurden auf dem Magnetrührer 15 Min. lang auf 80°C erhitzt. Zu der heißen Lösung wurde solange H_2O zugetropft, bis die Lösung alkalisch reagierte (Universalindikatorpapier). Nach dem Abkühlen wurde die wäßrige Phase abgetrennt.

5 mg 6-Desoxychamissonolid wurde in 1 ml KOH/Dioxan - Reagenz 1 Std. lang auf 70°C erwärmt. Nach Abkühlen der farblosen Lösung wurde diese mit 10%iger HCl auf pH 4,5 eingestellt (MN - Spezial - Indikatorpapier pH 0,5 - 5,5) und der Ansatz im Trocknungsofen TO-50 (Fa. BÜCHI) bei 40°C über Phosphorpentoxid im Vakuum zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde auf dem Magnetrührer 10 mal mit je 5 ml Ether p.a. eluiert, die vereinigten Etherphasen mit H_2O gewaschen und über $CaCl_2$ sicc. getrocknet. Nach Abziehen des Ethers verblieb ein farbloser Rückstand, der nach Trocknen im Vakuumexsikkator über Blaugel auskristallisierte. Diese weißen Kristalle wurden in wenig Methanol gelöst der GC- und GC/MS - Analyse zugeführt.

6. 2-Desacetylchamissonolid

Die Teilfraktion VIII (62,1 mg) wurde durch präparative DC mit Ethylacetat über 15 cm aufgetrennt. Dabei fielen 10,4 mg einer mit 2-Desacetylchamissonolid angereicherten Fraktion an, die nach der GC - Analyse jedoch aus zwei Komponenten

bestand. Durch präparative HPLC in System I konnten 3 mg gc rein gewonnen werden.

MS: m/z 282 (M^+, 1), 264 (3), 246 (4), 228 (2), 218 (6), 192 (16), 173 (4), 159 (6), 145 (7), 138 (21), 135 (6), 133 (7), 131 (6), 125 (9), 123 (11), 121 (11), 107 (100), 97 (18), 95 (18), 93 (29), 91 (13), 81 (17), 79 (17), 69 (20), 67 (18), 55 (20), 53 (9), 43 (38) (%)

UV: λ_{max} 216 nm, Methanol

^{1}H-NMR - Daten s. Tab. 4 , S. 26 und Tab. 5 , S.27

DC: hR_f - Werte s. Tab. 15, S. 107

GC: RT s. Tab. 16, S. 107

Nach Acetylierung war die Substanz nach DC-, GC- und GC/MS - Analyse identisch mit 4,6-Di-O-acetylchamissonolid.

MS: m/z 408 (M^+, 1), 364 (7), 348 (2), 306 (34), 288 (5), 264 (1), 246 (13), 228 (10), 218 (28), 192 (2), 173 (7), 159 (3), 145 (8), 138 (25), 135 (17), 133 (12), 131 (4), 125 (3), 123 (7), 121 (8), 107 (59), 97 (7), 95 (8), 93 (15), 91 (11), 81 (13), 79 (9), 69 (6), 67 (5), 55 (5), 53 (2), 43 (100) (%)

7. Gewinnung von 2-Desacetylchamissonolid durch alkalische Hydrolyse von Chamissonolid

Die Hydrolyse von 30 mg Chamissonolid erfolgte mit 6 ml KOH/Dioxan - Reagenz wie unter 5., S. 109 beschrieben. Der hochviskose hellgelbe Rückstand der Hydrolyse wurde in wenig Methanol gelöst der GC - Analyse und der präparativen HPLC (System III, S. Abb. 44, S. 102) zugeführt.

Ausbeute: 5,7 mg 2-Desacetylchamissonolid, dc und gc einheitlich

8. Chamissonolid

In Teilfraktion III (120,5 mg) fielen bereits nach dem Abziehen des Elutionsmittels bzw. beim Stehenlassen weiße Kristalle an. Nach Umkristallisation aus Ethanol erwiesen sich die nadelförmigen, dc und gc einheitlichen Kristalle als Chamissonolid (34,9 mg).

MS: m/z 324 (M^+, 3), 306 (2), 264 (5), 246 (22), 228 (11), 218 (21), 192 (29), 173 (14), 159 (11), 145 (13), 138 (35), 135 (21), 133 (24), 131 (12), 125 (17), 123 (18), 121 (19), 107 (100), 97 (29), 95 (22), 93 (46), 91 (22), 81 (32), 79 (24), 69 (29), 67 (19), 55 (22), 53 (9), 43 (98) (%)
Schmp.: 202 - 203,5°C
DC: hR_f - Werte s. Tab. 15, S. 107
GC: RT s. Tab. 16, S. 107
Die Daten waren jeweils identisch mit der Vergleichssubstanz.

9. 4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid

Teilfraktion I (11,5 mg) enthielt ein Sl, das im direkten Vergleich durch DC-, GC- und GC/MS - Analyse als 4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid identifiziert wurde. Ein Teil der Substanz kristallisiert am Rand des Reagenzglases aus.

MS: m/z 350 (M^+, < 1), 308 (1), 290 (1), 248 (11), 230 (100), 215 (16), 197 (11), 188 (13), 185 (18), 175 (10),

169 (13), 159 (14), 145 (32), 132 (38), 119 (91), 108 (31), 107 (32), 105 (26), 94 (17), 93 (24), 91 (37), 81 (15), 79 (20), 77 (14), 67 (18), 60 (13), 55 (19), 53 (18), 43 (95) (%)

Schmp.: 150 - 152°C (150 - 152°C, WILLUHN u. Mitarb., im Druck)

DC: hR_f - Werte s. Tab. 15, S. 107

GC: RT s. Tab. 16, S. 107

10. 11,13-Dihydrohelenalin

Die Teilfraktion V (17,3 mg) wurde durch präparative HPLC (Sytem II) aufgetrennt (s. Abb. 45, S. 102). Nach Umkristallisation aus Ether p.a. fielen 2,7 mg gelblich-weiße, dc und gc einheitliche Kristalle an. Nach Schmp., UV - Spektrum, DC-, GC- und GC/MS - Analyse handelt es sich um 11,13-Dihydrohelenalin.

MS: m/z 264 (M^+, 15), 246 (20), 236 (17), 231 (34), 191 (8), 175 (8), 173 (11), 149 (9), 148 (11), 147 (9), 145 (12), 137 (22), 135 (10), 124 (100), 123 (60), 122 (37), 107 (17), 96 (22), 95 (38), 91 (13), 79 (12), 77 (12), 71 (16), 69 (13), 67 (17), 55 (19), 41 (25) (%)

Schmp.: 229 - 232°C

UV: λ_{max} 227 nm, Ethanol

DC: System 1, 2, 4 und 5: hR_f 7, 26, 62 bzw. 21

GC: System 1 und 4: RT 3,6 bzw. 1,3 Min.

Die Werte waren jeweils identisch mit denen der authentischen Vergleichssubstanz.

VI. Aufarbeitung der Blüten von A. sachalinensis

1. Extraktion

In Anlehnung an POPLAWSKI u. Mitarb. (1971) und HERRMANN (1978) wurden 4,37 kg getrocknete und gemahlene Blütendroge im Soxhletverfahren mit Petrolether (40 - 60°C) erschöpfend extrahiert. Nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum verblieben 296,5 g eines zähflüssigen, grün-gelben Rückstandes (= 6,79% vom Blütentrockengewicht). Von diesem wurde eine 10%ige Lösung in Petrolether hergestellt, die 8 mal mit dem gleichen Volumen 60%igen Ethanol ausgeschüttelt wurde. Nach Abzug des Ethanols am Rotavapor wurden jeweils 500 ml der wäßrigen, milchigtrüben, gelb-grünen Phase 8 mal mit je 350 ml Ether ausgeschüttelt. Die vereinigten Etherauszüge wurden über $CaCl_2$ getrocknet und im Vakuum vom Lösungsmittel befreit. Als Rückstand resultierten 50,7 g einer grün-gelben, zähflüssigen Fraktion (= 1,16% vom Blütentrockengewicht).

2. Säulenchromatographische Auftrennung des Extraktes

40,0 g des Extraktes wurden an 5 mit jeweils 800 g Kieselgel 60 gefüllten Säulen unter gleichen Bedingungen aufgetrennt. Eluiert wurde mit Petrolether, Petrolether/Ether - Gemischen (95/5, 90/10, 85/15, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50, 40/60, 20/80), Ether, Aceton und Methanol/Chloroform (50/50). Der Wechsel des Elutionsmittels erfolgte jeweils, wenn dc keine größeren Substanzmengen mehr nachweisbar waren. Es wurden Fraktionen zu 15 ml aufgefangen und nach dc Kontrolle zu 9 Teilfraktionen vereinigt (s. Abb. 12,

Tabelle 17 : SC - Auftrennung des Blütenextraktes an Kieselgel 60 (DC: System 6; Detektion: Anisaldehyd/H_2SO_4, Hydroxylamin/$FeCl_3$ und ZIMMERMANN - Reagenz, s. Abb. 12, S. 38)

Teil-fraktion	g	Komponenten (hR_f)
I	0,32	Substanz A (93)
II	0,49	Substanz A und B (79)
III	1,57	Substanz A und B
IV	1,83	Substanz B und C (75)
V	1,74	Substanz C und D (71)
VI	7,66	Substanz D
VII	3,84	Substanz D und E (37)
VIII	3,49	Substanz E und F (25)
IX	8,47	Substanz F

Tabelle 18 : hR_f - Werte der isolierten Thymolderivate und des Chromenderivates in den Fließmittel - Systemen 6, 7, 8, 11 und 15

Verbindung	Fließmittel - System				
	6	7	8	11	15
Thymolisobutyrat (A)	93	70	79	88	90
Substanz E-ac	86	19	60	n.b.	30
Thymol (B)	79	38	70	79	55
Substanz C	75	27	62	72	47
Substanz D	71	12	58	57	31
Substanz E	37	2	41	24	4
Substanz F	25	1	33	15	6

Tabelle 19 : Retentionszeiten (Min.) der isolierten Thymolderivate und des Chromenderivates in den GC - Systemen 5 und 6

Verbindung	GC - System 5	6
Thymol (B)	1,0	-
Thymolisobutyrat (A)	2,5	-
Substanz C	3,6	0,8
Substanz D	6,8	1,9
Substanz F	8,6	3,0
Substanz E-ac	16,7	10,1

S. 38). Tabelle 17 gibt das Trennergebnis wieder. In den Tabellen 18 und 19 sind die hR_f - Werte bzw. die Retentionszeiten der isolierten und identifizierten Substanzen zusammengefaßt.

3. Substanz C (6-Acetyl-2,2-dimethyl-2H-chromen = Desmethoxy-encecalin

1,25 g der Teilfraktion IV wurden an 180 g Kieselgel 60 mit Benzol sc aufgetrennt. Dabei wurden 161,4 mg einer Fraktion erhalten, in der die ZIMMERMANN - positive Substanz C stark angereichert vorlag. Erneute sc Auftrennung an 32 g Kieselgel 60 mit Petrolether und Petrolether/Ether - Gemischen (Steigerung des Etheranteils um jeweils 2% nach 1 Liter bzw. 400 ml Elutionsmittel) führte zur Isolierung von 72,5 mg dc und gc annähernd reiner Substanz C in Form eines hellgelben Öles.

MS: m/z 202 (M^+, 45), 188 (48), 187 (100), 159 (4), 145 (11), 144 (60), 115 (18), 91 (6), 86 (20), 77 (6), 72 (9), 65 (4), 63 (6), 58 (9), 51 (7), 44 (6), 43 (28) (%)

CH - Analyse: Gef: C: 76,69; H: 7,06; (O: 16,25)

Ber: C: 77,30; H: 6,99; (O: 15,84)

Summenformel: $C_{13}H_{14}O_2$

UV: λ_{max} 254 nm, Ethanol (ϵ = 19614; weitere Maxima bei 323,5; 310; 273; 246 und 229 nm)

IR: 3040, 1600, 1570 und 1485 cm^{-1} (Aromat), 1670 cm^{-1} (Arylketon), 1640 cm^{-1} (Doppelbindung in Konjugation zum Aromaten), 1365 cm^{-1} (geminale Methylgruppen), 1270 cm^{-1} (Acetylgruppe), 1135 - 1110 cm^{-1} (Ether), 960 cm^{-1} (Doppelbindung), 880 und 825 cm^{-1} (1,3,4-Trisubstitution)

^{13}C- u. ^1H-NMR - Daten s. Tab. 6, S. 43 u. Tab. 7, 8, S. 46

DC: hR_f - Werte s. Tab. 18, S.114

GC: RT s. Tab. 19, S. 115

4. Darstellung des 2,4-Dinitrophenylhydrazon - Derivates der Substanz C

10 mg Substanz C wurden in 0,5 ml 95%igem Ethanol gelöst. Nach Zusatz von 0,5 ml 2,4-Dinitrophenylhydrazin - Reagenz (0,2 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin + 1 ml H_2SO_4, 95 - 97%ig + 1,5 ml H_2O + 5 ml Ethanol, 95%ig, s. Organikum) fiel ein fein-kristalliner roter Niederschlag aus, der mit Wasser gewaschen und zweimal aus Chloroform/Methanol (5/5) umkristallisiert wurde.

Schmp.: 230 - 232°C; UV: λ_{max} 393 nm, Ethanol (ϵ = 23457)

Literatur: Schmp.: 230 - 232°C; UV: λ_{max} 393 nm;
ϵ = 23600 (BOHLMANN u. GRENZ, 1970)

5. Thymol (Substanz B)

250 mg der Teilfraktion IV wurden in wenig Benzol aufgenommen, mit einem Petrolether/Benzol/Chloroform/Methanol - Gemisch (5/4/1/2) über eine Säule mit 22 g Alumina WOELM N Super I filtriert und der Filtratrückstand (0,19 g) an 50 g Kieselgel 60 mit Benzol sc aufgetrennt. Es wurden Fraktionen zu 3 ml aufgefangen. Hierbei fiel eine Fraktion von 110 mg an, die als Hauptkomponente Thymol führte. Zur weiteren Reinigung wurde die Fraktion in 10 ml Chloroform gelöst, 5 mal mit je 5 ml einer 0,5-N-NaOH - Lösung extrahiert und aus den vereinigten NaOH - Phasen nach Ansäuern mit Schwefelsäure Thymol mit Ether ausgeschüttelt. Nach zweimaliger Umkristallisation des Etherrückstandes aus Ethanol wurden 64,6 mg dc und gc einheitliche, weiße bis hellgelbe, plättchenförmige Kristalle erhalten.

MS: m/z 150 (M^+, 30), 136 (11), 135 (100), 117 (10), 116 (5), 115 (19), 107 (18), 105 (8), 91 (27), 79 (8), 77 (10), 65 (8), 51 (7), 43 (5), 41 (5) (%)
Schmp.: 50 - 52°C
UV: λ_{max} 277 nm, Ethanol (ϵ = 2188)
IR: 3220 und 1240 cm^{-1} (OH - Gruppe), 3035, 1620, 1580 und 1515 cm^{-1} (Aromat), 2865 und 1460 cm^{-1} (CH_3 - Gruppe), 1380 und 1360 cm^{-1} (Isopropylgruppe), 855 und 805 cm^{-1} (1,4-Di- bzw. 1,3,4-Trisubstitution)

DC: hR_f - Werte s. Tab. 18, S. 114

GC: RT s. Tab. 19, S. 115

Die Werte waren jeweils identisch mit der Vergleichssubstanz.

6. Thymolisobutyrat (Substanz A)

50 mg der Teilfraktion I wurden durch präparative DC mit Benzol über 15 cm aufgetrennt. Dabei fielen 16,4 mg einer mit Thymolisobutyrat angereicherten Fraktion an, aus der nach erneuter präparativer DC im selben System die Substanz als dc und gc einheitliches farbloses Öl gewonnen werden konnte (6,8 mg).

MS: m/z 220 (M^+, 7), 151 (5), 150 (61), 136 (7), 135 (80), 105 (7), 91 (11), 79 (5), 77 (7), 71 (39), 65 (5), 51 (4), 44 (5), 43 (100), 41 (31) (%)

UV: λ_{max} 272,5 und 265 nm, Methanol

DC: hR_f - Werte s. Tab. 18, S. 114

GC: RT s. Tab. 19, S. 115

Die Werte waren jeweils identisch mit der Vergleichssubstanz.

7. Alkalische Hydrolyse von Thymolisobutyrat

5 mg Thymolisobutyrat wurden in Anlehnung an KATING u. Mitarb. (1973) mit 0,5 ml 0,5-N-methanolische Natronlauge 1 Std. lang auf 70°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die farblose Lösung mit 10%iger HCl auf pH 5 eingestellt (MN - Spezial - Indikatorpapier pH 0,5 - 5,5) und mit

Ether ausgeschüttelt. Zur Isolierung der Säurekomponente wurde die Etherphase (1) mit 5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung extrahiert und daraus nach Ansäuern mit 10%iger HCl mit Ether (2) ausgeschüttelt. Nach Abziehen der über Na_2SO_4 sicc. getrockneten Etherphase (2) erhaltene Rückstand wurde direkt der GC - Analyse im System 8 zugeführt, mit Isobuttersäure und n-Buttersäure (MERCK) als Vergleichssubstanzen. Die Alkoholkomponente wurde aus der mit $NaHCO_3$ - Lösung ausgeschüttelten und über Na_2SO_4 sicc. getrockneten Etherphase (1) durch DC- und GC - Analyse als Thymol identifiziert (DC - System 8 und 15; GC - System 5).

8. Substanz D (10-Acetoxy-8,9-epoxy-thymol-isobutyrat)

2,19 g der Teilfraktion VI wurden an 450 g Kieselgel 60 mit Benzol/Ether (80/20) sc aufgetrennt. Hierbei fielen 1,38 g einer mit Substanz D angereicherten Fraktion an. Durch erneute SC an 160 g Kieselgel mit Cyclohexan/Ether (85/15) konnte eine weitere Reinigung erzielt werden (1,23 g). Weitere SC an 270 g Kieselgel mit $CHCl_3$/n-Hexan (95/5) lieferte 570 mg gc annähernd reine Substanz D. Für die spektroskopischen Untersuchungen wurde sie durch präparative HPLC im System IV gereinigt. Dabei wurden 259,3 mg gc reine Substanz D als hellgelbes Öl erhalten.

MS: m/z 292 (M^+, 1), 262 (1), 232 (5), 221 (4), 219 (14), 204 (11), 191 (16), 177 (7), 163 (10), 162 (68), 161 (30), 150 (23), 149 (95), 147 (6), 146 (11), 145 (43), 135 (19), 134 (12), 133 (30), 132 (6), 121 (11), 119 (6), 105 (13),

91 (8), 89 (5), 77 (7), 71 (52), 65 (2), 60 (1), 51 (1), 45 (11), 44 (8), 43 (100), 41 (7), 40 (6), (%)

CH - Analyse: Gef.: C: 66,03; H: 7,18; (O: 26,79)

Ber.: C: 65,81; H: 7,59; (O: 27,39)

Summenformel: $C_{16}H_{20}O_5$

UV: λ_{max} 264,5 und 272,5 nm, Methanol (ϵ = 370 bzw. 319)

IR: 3035, 1620, 1575 und 1505 cm^{-1} (Aromat), 1745 cm^{-1} (Ester), 2875 und 1465 cm^{-1} (CH_3 - Gruppe), 1390 und 1370 cm^{-1} (Isopropylgruppe), 1250, 920 und 820 cm^{-1} (Epoxid), 1240 cm^{-1} (Acetat), 1140 und 1095 cm^{-1} (Ether)

^{13}C- u. ^{1}H-NMR - Daten s. Tab. 9, S. 55 u. Tab. 10, 11, S. 58

DC: hR_f - Werte s. Tab. 18, S. 114

GC: RT s. Tab. 19, S. 115

9. Substanz F (10-Acetoxy-8-hydroxy-9-isobutyryloxy-thymol)

4,08 g der Teilfraktion IX wurden einer wiederholten SC unterworfen. Chromatographie an 400 g Aluminiumoxid mit Petrolether/Benzol/Chloroform/Methanol (5/4/1/2) lieferte 1,18 g einer mit Substanz F angereicherten Fraktion. Erneute SC an 200 g Kieselgel mit Chloroform/n-Hexan (95/5) als Elutionsmittel lieferte 870 mg und weitere SC an 130 g Kieselgel mit n-Pentan/Ether (50/50) 510 mg nicht vollständig reiner Substanz F. Für die spektroskopischen Untersuchungen wurde ein Teil dieser Fraktion durch präparative HPLC im System IV gereinigt. Danach lagen 94,2 mg der Substanz F gc einheitlich als hellgelbes Öl vor.

MS: m/z 310 (M^+, 12), 292 (4), 252 (5), 237 (28), 222 (1), 209 (36), 168 (8), 167 (86), 163 (11), 162 (50), 161 (17), 150 (9), 149 (66), 145 (16), 135 (28), 134 (8), 133 (22), 129 (5), 121 (22), 119 (5), 115 (6), 105 (24), 103 (5), 101 (7), 91 (11), 88 (11), 79 (8), 77 (15), 73 (14), 71 (85), 70 (12), 65 (4), 61 (14), 60 (9), 57 (6), 51 (3), 45 (18), 43 (100), 41 (16) (%)

CH - Analyse: Gef.: C: 62,03; H: 7,18; (O: 30,79)

Ber.: C: 61,99; H: 7,15; (O: 30,96)

Summenformel: $C_{16}H_{22}O_6$

UV: λ_{max} 277 und 282 nm, Methanol (ϵ = 2632 und 2614)

IR: 3560 und 3360 cm^{-1} (OH - Gruppen), 3035, 1625, 1575 und 1505 cm^{-1} (Aromat), 1735 cm^{-1} (Ester), 2880 und 1460 cm^{-1} (CH_3 - Gruppe), 1390 - 1365 cm^{-1} (Isopropylgruppe), 1240 cm^{-1} (Acetat)

^{13}C- und ^{1}H-NMR - Daten s. Tab. 12, S. 62 und Tab. 13, S. 66

DC: hR_f - Werte s. Tab. 18, S. 114

GC: RT s. Tab. 19, S. 115

10. Substanz E

280 mg der Teilfraktion VIII wurde mit einem Petrolether/Benzol/Chloroform/Methanol - Gemisch (5/4/1/2) über eine Säule mit 250 g equilibriertem Aluminiumoxid Aktivitätsstufe II filtriert. Nach dem Abziehen des Elutionsmittels bzw. beim Stehenlassen der filtrierten Fraktion im Kühlschrank fiel ein weißer, mikrokristalliner Niederschlag aus. Auch nach mehrmaliger Umkristallisation aus Cyclohexan, Aceton oder Ethanol und verschiedenen Lösungsmit-

telgemischen blieb der mikrokristalline Charakter der Substanz erhalten. DC war sie einheitlich.

MS: m/z 340 (M^+, 2), 322 (1), 312 (8), 311 (34), 293 (4), 283 (5), 265 (2), 203 (8), 175 (15), 163 (6), 162 (9), 161 (8), 159 (4), 158 (4), 151 (3), 148 (2), 147 (4), 145 (4), 136 (10), 135 (100), 134 (4), 133 (6), 132 (3), 131 (8), 121 (2), 119 (3), 116 (2), 11 (3), 107 (2), 105 (5), 91 (7), 79 (2), 77 (4), 55 (4), 51 (1), 43 (4) (%)

CH - Analyse: Gef.: C: 69,40; H: 5,96; (O: 24,64)

Ber.: C: 70,65; H: 5,93; (O: 23,53)

Summenformel: $C_{20}H_{20}O_5$

Schmp.: 186°C

UV: λ_{max} 283 nm, Methanol (ϵ = 7114; Schulter bei 289 nm)

IR: 3420 und 3335 cm^{-1} (OH - Gruppen), 3020, 1615, 1595 und 1505 cm^{-1} (Aromat), 2860 und 1430 cm^{-1} (CH_3 - Gruppe), 1150 - 1050 cm^{-1} (Ether), 860 und 810/800 cm^{-1} (1,4-Di- bzw. 1,3,4-Trisubstitution)

DC: hR_f - Werte s. Tab. 18, S. 114

11. Acetylierung der Substanz E

20 mg Substanz E wurden in 1,0 ml einer Mischung aus Acetanhydrid und frisch über Phosphorpentoxid destilliertem Pyridin (1/1) gelöst und 48 Std. lang bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß stehen gelassen. Das überschüssige Reagenz wurde im Trocknungsofen TO-50 (Fa. BÜCHI) bei Raumtemperatur über Phosphorpentoxid im Vakuum über Nacht abgezogen (Lichtausschluß). Nach zweimaliger Umkristalli-

sation aus Aceton wurde das ebenfalls mikrokristalline Acetylderivat der DC-, GC-, GC/MS-, IR- und ^{1}H-NMR - Analyse zugeführt.

MS: m/z 424 (M^+, 18), 364 (12), 322 (7), 321 (6), 305 (21), 304 (82), 293 (24), 276 (14), 275 (12), 218 (6), 217 (40), 205 (6), 204 (30), 203 (5), 189 (5), 176 (13), 175 (99), 173 (7), 163 (39), 162 (74), 161 (29), 160 (53), 159 (24), 158 (70), 157 (11), 150 (5), 148 (7), 147 (48), 145 (43), 136 (12), 135 (100), 134 (15), 133 (23), 132 (20), 131 (19), 129 (10), 121 (5), 119 (8), 116 (7), 115 (17), 107 (9), 105 (21), 104 (8), 103 (11), 91 (19), 79 (13), 78 (11), 77 (31), 65 (8), 63 (7), 60 (7), 55 (5), 51 (13), 45 (7), 43 (97) (%)

Schmp.: 199 - 202°C

IR: 3035, 1620, 1595 und 1495 cm^{-1} (Aromat), 2880 und 1430 cm^{-1} (CH_3 - Gruppe), 1755 cm^{-1} (Ester), 1240 und 1215 cm^{-1} (Acetat), 1125 - 1050 cm^{-1} (Ether)

360 MHz ^{1}H-NMR - Daten (ppm; $CDCl_3$): 7,426 (d, H-5); 7,397 (d, H-5'); 6,868 (d(br), H-6'); 6,811 (d(br), H-6); 6,778 (s(br), H-2'); 6,758 (s, 1H); 6,718 (s(br), H-2); 6,075 (s, 1H); 2,773 (ddd, 1H); 2,557 (ddd, 1H); 2,353 (s(br), CH_3 an C-1); 2,345 (s(br), CH_3 an C-1'); 2,10 (m, 1H); 2,070 (s, CH_3 von Ac); 1,930 (s, CH_3 von Ac); 1,714 (ddd, 1H)

Kopplungskonstanten J (Hz): H-5/H-6 = 7,9; H-5'/H-6' = 7,7; H-2/H-6 sowie H-2'/H-6' = 1,5; H-2/H-5 sowie H-2'/H-5' = <1; H-2/CH_3 an C-1 sowie H-2'/CH_3 an C-1' = <1; H-6/CH_3 an C-1 sowie H-6'/CH_3 an C-1' = <1

DC: hR_f - Werte s. Tab. 18, S. 114

GC: RT s. Tab. 19, S. 115

VII. Die ätherische Ölanalyse

Zur quantitativen Bestimmung des ätherischen Öles wurde die Karlsruher Apparatur in Anlehnung an STAHL (1953) verwandt. Jeweils 10,0 g grob gemahlene Blütenkörbchen (IKA - Analysenmühle) wurden in 200 ml Wasser mit einer Destillationsgeschwindigkeit von etwa 2 ml / Min. 5 Std. lang destilliert. Zum Auffangen des ätherischen Öles wurden 2 ml Pentan als Vorlage in die Apparatur gegeben. Nach beendeter Destillation wurde das im Pentan gelöste ätherische Öl in ein Mikrokölbchen überführt, die Apparatur mit Pentan gespült, das Lösungsmittel im Vakuumexsiccator über Blaugel abgezogen und das ätherische Öl sodann bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Tabelle 20 : hR_f - Werte der im ätherischen Öl nachgewiesenen Thymolderivate und des Chromenderivates in den Fließmittel - Systemen 7 und 15

Verbindung	Fließmittel - System 7	15
Thymolmethylether	93	96
6-OH-Thymoldimethylether	85	94
Thymolisobutyrat (A)	70	90
Thymol (B)	38	55
Substanz D	12	31

Tabelle 21 : Retentionszeiten (Min.) der im ätherischen Öl nachgewiesenen Thymolderivate und des Chromenderivates in den GC - Systemen 7 und 8

Verbindung	GC - System 7	8
Thymolmethylether	2,1	2,0
Thymol (B)	2,8	12,6
6-OH-Thymoldimethylether	5,6	5,9
Thymolisobutyrat (A)	7,6	6,6
Substanz D	18,8	26,4

Die Blütenkörbchen führten, bezogen auf ihr Trockengewicht, in den Erntejahren 1979, 1980 und 1982 1,18, 1,11 bzw. 1,27% ätherisches Öl. Diese wurde sofort der DC-, GC- und GC/MS - Analyse zugeführt. In den Tabellen 20 und 21 sind die hR_f - Werte bzw. Retentionszeiten der Thymolderivate und des Chromenderivates wiedergegeben.

G. Literaturverzeichnis*

ADAMS, R. u. W. HERZ: Helenalin. I. Isolation and properties; J. Am. Chem. Soc. 71, 2546-2551 (1949a)

ADAMS, R. u. W. HERZ: Helenalin. III. Reduction and dehydrogenatin; J. Am. Chem. Soc. 71, 2554-2559 (1949b)

ANTHONSEN, T.: New chromenes from Eupatorium species; Acta Chem. Scand. 23, 3605-3607 (1969)

BJELDANES, L. F. u. T.A. GEISSMAN: Euparinoid constituents of Encelia californica; Phytochemistry 8, 1293-1296 (1969)

BOHLMANN, F. u. M. GRENZ: Neue Isopentenyl-acetophenon-Derivate aus Helianthella uniflora; Chem. Ber. 103, 90-96 (1970)

BOHLMANN, F. u. M. GRENZ: Über Inhaltsstoffe der Gattung Flourensia; Chem. Ber. 110, 295-300 (1977)

BOHLMANN, F. u. J. JAKUPOVIC: Neue Sesquiterpene, Triterpene, Flavanone und andere aromatische Verbindungen aus Flourensia heterolepis; Phytochemistry 18, 1189-1194 (1979)

BOHLMANN, F. u. M. LONITZ: Neue Eudesman-Derivate und andere Sesquiterpene aus Verbesina-Arten; Chem. Ber. 111, 254-263 (1978)

BOHLMANN, F. u. C. ZDERO: Neue Thymol-Derivate aus Arnica amplexicaulis; Tetrahedron Let. 28, 2827-2828 (1972)

BOHLMANN, F. u. C. ZDERO: Notiz über neue Inhaltsstoffe aus Wedelia forsteriana Endl.; Chem. Ber. 109, 791-792 (1976)

BOHLMANN, F. u. C. ZDERO: Ein neues Thymol-Derivat aus Callilepis laureola; Phytochemistry 16, 1854-1855 (1977)

---

*Die Abkürzungen der Fachzeitschriften erfolgen nach den Angaben des Chemical Abstracts Service Source Index

BOHLMANN, F. u. C. ZDERO: Über dimere Terpenketone aus Tagetes gracilis; Phytochemistry 18, 341-343 (1979)

BOHLMANN, F., U. NIEDBALLA u. J. SCHULZ: Über einige Thymol-Derivate aus Gaillardia- und Helenium-Arten; Chem. Ber. 102, 864-871 (1969)

BOHLMANN, F., J. JAKUPOVIC u. M. LONITZ: Über Inhaltsstoffe der Eupatorium Gruppe; Chem. Ber. 110, 301-314 (1977a)

BOHLMANN, F., K.-H. KNOLL, C. ZDERO, P.K. MAHANTA, M. GRENZ A. SUWITA, D. EHLERS, N. LE VAN, W.-R. ABRAHAM u. A.A. NATU: Terpen-Derivate aus Senecio- Arten; Phytochemistry 16, 965-985 (1977b)

BOHLMANN, F., P.K. MAHANTA, A. SUWITA, A. SUWITA, A.A. NATU, C. ZDERO, W. DORNER, D. EHLERS u. M. GRENZ: Neue Sesquiterpenlactone und andere Inhaltsstoffe aus Vertretern der Eupatorium-Gruppe; Phytochemistry 16, 1973-1981 (1977c)

BOHLMANN, F., P.K. MAHANTA, J. JAKUPOVIC, R.C. Rastogi,u. A.A. NATU: New sesquiterpene lactones from Inula species; Phytochemistry 17, 1165-1172 (1978a)

BOHLMANN, F., P. ZITZKOWSKI, A. SUWITA u. L. FIEDLER: cis-Kolaveninsäure und weitere Inhaltsstoffe aus Vertretern der Tribus Eupatorieae; Phytochemistry 17, 2101-2105 (1978b)

BOHLMANN, F., A.A. NATU,u. K. KERR: Thymol-Derivate aus Neurolaena-Arten; Phytochemistry 18, 489-490 (1979)

BOHLMANN, F., K.A. DHAR u. M. AHMED: Thymol-derivates from Doronicum hungaricum; Phytochemistry 19, 1850-1851 (1980)

BOHLMANN, F., W.-R. ABRAHAM, H. ROBINSON,u R. KING: Heliangolides and other constituents from Bejaranoa semistriata; Phytochemistry 20, 1639-1642 (1981a)

BOHLMANN, F., A.K. DAHR, R.M.KING u. H. ROBINSON: A guaianolide from Guevaria sodiroi; Phytochemistry 20, 1144-1145 (1981b)

BOHLMANN, F., U. FRITZ, R.M. KING u. H. ROBINSON: Fourteen Heliangolides from Calea species; Phytochemistry 20, 743-749 (1981c)

BOHLMANN, F., J. JAKUPOVIC, M. AHMED, M. WALLMEYER, H. ROBINSON u. R.M. KING: Labdane derivates from Hemizonia species; Phytochemistry 20, 2383-2387 (1981d)

BOHLMANN, F., W. KRAMP, M. GRENZ, H. ROBINSON u. R.M. KING: Diterpenes from Baccharis species; Phytochemistry 20, 1907-1913 (1981e)

BOHLMANN, F., C. ZDERO, R.M. KING u. H. ROBINSON: Heliangolides and Nerolidol and p-hydroxy-acetophenone derivates from Calea species; Phytochemistry 20, 1643-1647 (1981f)

BOHLMANN, F., J. JAKUPOVIC, R.M. KING u. H. ROBINSON: New Labdane derivates from Madia sativa; Phytochemistry 21, 1103-1107 (1982)

BOHM, B.A.: Helenieae (sensu Bentham) - chemical review; in: HEYWOOD, V.H., J.B. HARBORNE u. B.L.TURNER: The Biology and Chemistry of the Compositae, 739-767 (1977)

BORKOWSKI, B., Z. KOWALESKI u. L. SKRZYPCZAKOWA: Badania skladu chemicznego kwiatostanow niektorych gatunkow rodzaju Arnica; Czesc. I. Analiza frakcji flawonoidowych, Diss. Pharm. Pharmacol. 18, 367-374 (1966)

BRUNNER, H.: Dünnschichtchromatographie zur Prüfung von Arzneidrogen 1. Mitteilung: Arnikawurzel; Dtsch. Apoth. Ztg. 109, 1723-1726 (1969)

BRUNZELL, A. u. S. WESTER: Jämförelser mellan Arnica chamissonis och Arnica montana; Svensk Farm. Tidskr. 51, 645-651 u. 693-703 (1947)

BURNETT, W.C., S.B. JONES, T.J. MABRY u. W.G. PADOLINA: Sesquiterpen lactones - Insect feeding deterrents in Vernonia; Biochem. Syst. Ecol. 2, 25-29 (1974)

DEUEL, P.G. u. T.A. GEISSMAN: Xanthinin. II. The structures of Xanthinin and Xanthatin; J. Am. Chem. Soc. 79, 3778-3783 (1957)

DIBBERN, H.W., D. OTT u. E. WIRBITZKI: Quantitative Dünnschichtchromatographie mit einfachen Mitteln; Dtsch. Apoth. Ztg. 111, 1649-1651 (1971)

DRAGENDORFF, G.: Die Heilpflanzen der verschiedenen Völker und Zeiten. Ihre Anwendung, wesentliche Bestandteile und Geschichte; Ferdinand Enke-Verlag, Stuttgart (1898)

DUQUÉNOIS, P: Une planta medicinale encore mystérieuse, l'Arnica montana; Pharm. Weekbl. 106, 190-197 (1971)

ESDORN, J.: Untersuchungen an Arnica montana L., die Lebensdauer ihres Saatgutes und ihre Anbaubedingungen; Die Deutsche Heilpflanze 6, 23 (1940)

EVSTRATOVA, R.I., V.I. SHEICHENKO, K.S. RYBALKO u. A.I. BANKOVSKII: The structure of Arnifolin, a sesquiterpene lactone from Arnica foliosa Nutt. and A. montana L.; Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal 3, (9), 39-45 (1969)

FAUST, C. u. S. B. JONES; Rhodora 75, 517 (1973); zitiert nach RODRIGUEZ u. Mitarb. (1976)

FEIGL, F., V. ANGER u. O. FREHDEN: Über die Verwendung von Tüpfelreaktionen zum Nachweis von organischen Verbindungen (II); Mikrochemie 15, 9-12 (1934)

FIORITI, F.A. u. R.J. SIMS: A spray reagent for the identification of epoxides on thin layer plates; J. Chromatogr. 32, 761-763 (1968)

FISCHER, N.H., R.A. WILEY u. D.L. PERRY: Rev. Latinoam. Quim. (1976), zitiert nach RODRIGUEZ u. Mitarb. (1976)

FISCHER, N.H., E.J. OLIVIER u. H.D. FISCHER: The biogenesis and chemistry of sesquiterpene lactones; in: L. ZECHMEISTER: Progress in the chemistry of organic natural products 38, Springer Verlag, Wien, New York (1979)

GEISSMAN, T.A.: The biogenesis of sesquiterpene lactones of the Compositae; in: Recent advances in phytochemistry 6, 65-95, Academic Press, New York/London (1973)

GONTZEL, U., F. SEIDEL u. H. KATING: Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten. I. Der Gehalt an ätherischem Öl in den Blüten verschiedener Arnica-Arten; Planta Med. 15, 205-214 (1967)

HALL, I.H., K.H. LEE, E.C. MAR u. C.O. STARNES: Antitumor agents 21. A proposed mechanism for inhibition of cancer growth by Tenulin and Helenalin and related cyclopentenones; J. Med. Chem. 20, 333-337 (1977)

HALL, I.H., K.H. LEE, C.O. STARNES, Y. SUMIDA, R.Y. WU, T.G. WADDELL, J.W. COCHRAN u. K.G. GERHART: Anti-inflammatory activity of sesquiterpene lactones and related compounds; J. Pharm. Sci. 68, 537-542 (1979)

HALL, I.H., K.H. LEE, C.O. STARNES u. T.G. WADDELL: Mode of action of sesquiterpene lactones as anti-inflammatory agents; J. Pharm. Sci. 69, 537-543 (1980a)

HALL, I.H., K.H. LEE, C.O. STARNES, O. MURAOKA, Y. SUMIDA u. T.G. WADDELL: Antihyperlipidemic activity of sesquiterpene lactones and related compounds; J. Pharm. Sci. 69, 694-697 (1980b)

HAUSEN, B.M.: Arnikaallergie; Der Hautarzt 31, 10-17 (1980)

HAUSEN, B.M., H.-D. HERRMANN u. G. WILLUHN: The sensitizing capacity of Compositae plants. I. Occupational contact dermatitis from Arnica longifolia EAT.; Contact Dermatitis 4, 3-10 (1978)

HEEGER, E.F.: Handbuch des Arznei- und Gewürzpflanzenanbaus; Berlin (1956)

HEGNAUER, R.: The taxonomic significance of alkoloids; in: T. SWAIN: Chemical Plant Taxonomy, 397-399, Academic Press, London, New York (1963)

HEGNAUER, R.: Chemotaxonomy - Past and Present; Lloydia 28, 267 (1965)

HEGNAUER, R.: Chemical evidence for the classification of some plant taxa; in: J.B. HARBORNE and T. SWAIN: Perspectives in Phytochemistry, 122, Academic Press, London, New York (1969)

HEGNAUER, R.: The chemistry of Compositae; in: V.H. HEYWOOD, J.B. HARBORNE u. B.L. TURNER: The Biology and Chemistry of the Compositae, 283-335 (1977)

HEROUT, V.: Taxonomisches Merkmal der Compositae; Planta Med. 14, 97-106 (1966)

HEROUT, V.: Chemotaxonomy of the family Compositae (Asteraceae); in: Pharmacognosy and phytochemistry; Springer Verlag, Heidelberg/New York (1971)

HEROUT, V. u. SORM, F.: Chemotaxonomy of sesquiterpenoids of the Compositae; in: Perspectives in phytochemistry; Academic Press, London/New York (1969)

HERRMANN, H.-D.: Die Sesquiterpenlactone der Blüten von Arnica longifolia Eaton und ihre Wirkungen; Dissertation, Düsseldorf (1978)

HERRMANN, H.-D., G. WILLUHN u. B.M. HAUSEN: Helenalinmethacrylate, a new pseudoguaianolide from the flowers of Arnica montana L. and the sensitizing capacity of their sesquiterpene lactones; Planta Med. 34, 299-304 (1978)

HERZ, W.: Pseudoguaianolides in Compositae; in: Recent advances in phytochemistry, 229-269, New York (1968)

HERZ, W.: Sesquiterpene lactones in Compositae; in: Pharmacognosy and phytochemistry, 65-91, Springer Verlag, New York (1971)

HESSE, M., H. MEIER u. B. ZEEH: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie; Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1979)

HEYWOOD, V.H., J.B. HARBORNE u. B.L. TURNER: An overture of the Compositae; in: HEYWOOD, V.H., J.B. HARBORNE u. B.L. TURNER: The Biology and Chemistry of the Compositae, 1-20 (1977)

HLADON, B., B. DROZDZ, M. HOLUB u. T. BORKIEWICZ: Sesquiterpene lactones XVI. In vitro studies on cytotoxic properties of sesquiterpene lactones in tissue cultures of human and animal malignant cells; Arch. Immunol. Ther. Exp. 23, 845-855 (1975)

HOLUB, M., Z. SAMEK u. J. TOMAN: Carabron from Arnica foliosa; Phytochemistry 11, 2627-2628 (1972)

HULTÉN, E.: Flora of Alaska and neighboring territories; Stanford University Press, Stanford (California), 915-924 (1968)

INAYAMA, S., T. KAWAMATA u. M. YANAGITA: Sesquiterpene lactones of Gaillardia pulchella; Phytochemistry 12, 1741-1743 (1973)

JARUZESKI, M., Z. KOWALEWSKI, I. MATLAWSKA u. L.SKRZYPCZAKOWA: Chemical composition of the inflorescence of some species of Arnica; Diss. Pharm. Pharmacol. 22, 25-33 (1970)

KATING, H., W. RINN u. F. SEIDEL: Das ätherische Öl von Arnica chamissonis Less.; Abhdl. Marburger Gelehrten Ges., Wilh. Fink Verlag, München; Heft 4 (1973)

KELSEY, R.G. u. F. SHAFIZADEH: Glandular trichomes and sesquiterpene lactones of Artemisia nova (Asteraceae); Biochem. Syst. Ecol. 8, 371-377 (1980)

KIM, H.L.: Toxicity of sesquiterpene lactones; Res. Com. Chem. Path. Pharmacol. 28, 189-192 (1980)

KOWALEWSKI, Z., C. SKRZYPCZAKOWA u. I. MATLAWSKA: Investigations on chemical composition of inflorescence of some Arnica species; Diss. Pharm. Pharmacol. 21, 249-252 (1969)

KRESKEN, J.: Dissertation in Vorbereitung, Universität Düsseldorf

KRESKEN, J. u. WILLUHN, G.: Weitere Sesquiterpenlactone aus den Blüten von Arnica chamissonis; Planta Med. 45, 132 (1982)

LABADIE, R.P.: Arnica montana L.; Pharm. Weekbl. 103, 769-774 (1968)

LAMSON, P.D.: On the pharmacological action of Helenin, the active principle of Helenium autumnale; J. Pharmacol. Exp. Ther. 4, 471-489 (1913)

LEE, K.-H., D.C. ANUFORO, E.S. HUANG u. C. PIANTADOSI: Antitumor agents I: Angustibalin, a new cytotoxic sesquiterpene lactone from Balduina angustifolia (Pursh.) Robins; J. Pharm. Sci. 61, 626-628 (1972)

LEE, K.-H., T. IBUKA, R.-Y. WU u. T.A. GEISSMAN: Structure-antimicrobial activity relationships among the sesquiterpene lactones and related compounds; Phytochemistry 16, 1177-1181 (1977a)

LEE, K.-H., M. HARUNA, H.C. HUANG, B.S. WU u. I.H. HALL: Antitumor agents XXIII: Helenalin, an antitumor principle from Anaphalis morrisonicola HAY.; J. Pharm. Sci. 66, 1194-1195 (1977b)

LIST, P.H. u. B. FRIEBEL: Neue Inhaltstoffe der Blüten von Arnica montana L.; Arzneim.- Forsch. 24, 148-151 (1974)

LUCKNER, M., BESSLER, O. u. R. LUCKNER: Vorschläge für den Drogenteil des DAB 7 - 14. Mitt.: Flores Arnicae; Pharmazie 20, 681-685 (1965)

MABRY, T.J. u. F. BOHLMANN: Biology and chemistry of the Compositae, Bd. 1 u. 2; Academic Press, New York (1977)

MAGUIRE, B.: A monograph of the genus Arnica; Brittonia 4, 386-511 (1943)

MIELKE, B.: Zur Analytik der Bitterstoffe Absinthin, Artabsin und Matricin aus Wermut (Artemisia absinthium); Dissertation, Frankfurt (1975)

NEHER, R.: Steroid chromatography; Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York (1964)

NORDENSTAM, B.: Senecioneae and Liabeae - systematic review; in: HEYWOOD, V.H., J.B. HARBORNE u. B.L.TURNER: The Biology and Chemistry of the Compositae, 799-830 (1977)

OLECHNOWICZ-STEPIEN, W. u. S. Stepien: In vitro and in vivo studies on the activity of Helenine and its components against some species of dermatophytes; Diss. Pharm. 15, 17-22 (1963)

Organikum. Organisch-chemisches Grundpraktikum, 15. Aufl.; VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin (1976)

PADOLINA, W.G.: The chemistry and distribution of new germacranolidtyp sesquiterpene lactones in North American, Mexican and South American taxa of the genus Vernonia (Compositae); Unpublished Ph.D. THESIS, University of Texas Austin (1973); zitiert nach RODRIGUEZ u. Mitarb. (1976)

POPLAWSKI, J., M. HODUB, Z. SAMEK u. V. HEROUT: On terpenes CCIX. Arnicolides - Sesquiterpenic lactones from the leaves of Arnica montana L.; Collect. Czech. Chem. Commun. 36, 2189-2199 (1971)

PRETZSCH, G.: Die Sesquiterpenlactone der Blüten von Arnica chamissonis Less. subsp. genuina Maguire sowie Untersuchungen zur Steroidführung von Costus spiralis; Dissertation, Düsseldorf (1982)

RINN, W.: Isobuttersäurethymylester - Hauptbestandteil des ätherischen Öles der Rhizome und Wurzeln von Arnica chamissonis; Planta Med. 18, 147-149 (1970)

ROBINS, D.J.: Senecioneae - chemical review; in: HEYWOOD, V.H., J.B. HARBORNE u. B.L.TURNER: The Biology and Chemistry of the Compositae, 831-850 (1977)

RODRIGUEZ, E., H. YOSHIOKA u. T.J. MABRY: The sesquiterpene lactone chemistry of the genus Parthenium (Comsitae); Phytochemistry 10, 1145-1154 (1971)

RODRIGUEZ, E., M.O. DILLON, T.J. MABRY, J.C. MITCHELL u. G.H.N. TOWERS: Dermatologically active sesquiterpene lactones in trichomes of Parthenium hysterophorus L. (Compositae); Experientia 32/2, 236-238 (1976)

RODRIGUEZ, E., G.H.N. TOWERS u. J.C. MITCHELL: Biological activities of sesquiterpene lactones: Phytochemistry 15, 1573-1580 (1976)

RÖTTGER, P.-M.: Isolierung und Identifizierung der Sesquiterpenlactone aus den Blütenkörbchen von Arnica montana L.; Dissertation, Düsseldorf (1981)

RÖTTGER, P.-M. u. G. WILLUHN: Die Identifizierung der Sesquiterpenlactone von Arnicae flos DAB 8; Pharm. Ztg. 125, 1803 (1980)

SAMEK, Z.: The determination of the stereochemistry of five-membered α,β-unsaturated lactones with an exomethylene double bond based on the allylic long-range couplings of exomethylene protons; Tetrahedron Lett. 9, 671-676 (1970)

SAMEK, Z.: On the validity of the "cis/trans" lactone rule for allylic coupling constants of the α-exomethylene protons in natural sesquiterpenic α-exomethylene γ-lactones; Collection Czechoslov. Chem. Commun. 43, 3210-3226 (1978)

SCOTT, A.J.: Interpretation of the Ultraviolett spectra of natural products; Pergamon Press, London; zitiert nach SENDRA u. CUÑAT (1980)

SEIDEL, F. u. H. KATING: Anbauversuche mit Arnica-Arten. I. Generative Vermehrung von Arnica montana L.; Planta Med. 15, 293-305 (1967)

SEIGLER, D.S., D.H. WILKEN u. J.J. JAKUPCAK: Chemical data related to the tribal affinities of Hulsea and Arnica; Biochem. Syst. Ecol. 2, 21-24 (1974)

SENDRA, J.M. u. CUÑAT, P.: Volatile phenolic constituents of Spanish Origanum (Coridothymus capitatus); Phytochemistry 19, 1513-1517 (1980)

SHIELDS, L.M.: Distribution of the bitter principle in the shoot of Helenium tenuifolium; Bot. Gazz. 113, 471-475 (1952)

SHTACHER, G. u. J. KASHMAN: Chemical investigation of volatile constituents of Inula viscosa Ait.; Tetrahedron 27, 1343-1349 (1971)

SORM, F. u. L. DOLJES: Guaianolides and germacranolides; Hermann, Paris (1965)

von SYDOW, E.: Mass spectrometry of terpenes. II. Monoterpene alcohols; Acta Chem. Scand. 17, 2504-2512 (1963)

SCHMITZ, R. u. H. KATING: Zur Frage des Thymol-Vorkommens in Arnica-Arten; Planta Med. 31, 311-314 (1977)

SCHULTE, K.E. u. G. ROCKER: Polyacetylene und einige andere neue Inhaltsstoffe der Arnica-Blüten; Arch. Pharm. 299, 468-480 (1966)

SCHULTE, K.E., REISCH, J. u. G. ROCKER: Einige neue Inhaltsstoffe der Wurzel von Arnica montana; Arch. Pharm. 296, 273-281 (1963)

SCHULTE, K.E., G. ROCKER u. K. REITHMAYR: Einige Inhaltsstoffe von Arnica chamissonis und anderen Arnica-Arten; Lloydia 32, 360-368 (1969)

STAHL, E.: Nachweis der Vorstufe des Azulens in den Drüsenhaaren der Schafgarbe (Achillea millefolium L. und andere Arten); Naturwissenschaften 39, 551-552 (1952)

STAHL, E.: Eine neue Apparatur zur gravimetrischen Erfassung kleinster Mengen ätherischer Öle; Mikrochimica Acta 40, 367-372 (1953)

STAHL, E.: Über Vorgänge in den Drüsenhaaren der Schafgarbe; Zeitschrift f. Botanik 45, 297-315 (1957)

STAHL, E: Dünnschichtchromatographie; Springer Verlag, Berlin/Heidelberg/New York (1962)

STEELINK, C. u. J.C. SPITZNER: Sesquiterpene lactones in chemotaxonomy; Phytochemistry 5, 357-365 (1966)

TAYLOR, D.R. u. J.A. WRIGHT: Chromenes from Eupatorium riparium; Phytochemistry 10, 1665-1667 (1971)

TSAI, L., J. HIGHET u. W. HERZ: The mass spectra of pseudoguaianolides related to Helenalin; J. Org. Chem. 34, 945-948 (1969)

TSCHIRCH, A.: Handbuch der Pharmakognosie Bd II, 1174, Verlag Chr. Hermann Tauchnitz, Leipzig 1917

WEBER, U. u. J. DEUFEL: Zur Cytologie der Drüsenhaare von Achillea millefolium; Arch. Pharm. 284, 318-323 (1951)

WILLUHN, G.: Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten. V. Gehalt und Gehaltsschwankungen an ätherischem Öl in den verschiedenen Organen von Arnica-Arten; Planta Med. 21, 221-245 (1972a)

WILLUHN, G.: Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten. VI. Charakterizierung und präparative Auftrennung der ätherischen Öle aus den Wurzeln, Rhizomen, Blättern und Blütenkörbchen verschiedener Arnica-Arten; Planta Med. 21, 329-342 (1972b)

WILLUHN, G.: Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten. VII. Die Zusammensetzung des ätherischen Öles aus den unterirdischen Organen und Blütenkörbchen verschiedener Arnica-Arten; Planta Med. 22, 1-33 (1972c)

WILLUHN, G.: Die Arnika - ein Beispiel gegenwärtiger pharmakognostischer Forschung; Der informierte Apotheker 1, 1-19 (1973)

WILLUHN, G.: Neuere Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica montana L.; Physikalische Medizin und Rehabilitation 16, 46-49 (1975)

WILLUHN, G.: Neue Ergebnisse der Arnikaforschung; Pharmazie in unserer Zeit 10, 1-7 (1981)

WILLUHN, G. u. M. EBERT: in Vorbereitung

WILLUHN, G. u. H.-D. HERRMANN: Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten. 9. Mitt.: Zwei Sesquiterpenlactone aus den Blüten von Arnica longifolia; Arch. Pharm. 309, 333-335 (1976)

WILLUHN, G. u. H.-D. HERRMANN: Dünnschichtchromatographische Identifizierung der Arnikablüten und Arnikatinktur (DAB 7) anhand ihrer Sesquiterpenlactone; Pharm. Ztg. 123, 1803-1808 (1978)

WILLUHN, G. u. H.-D. HERRMANN: Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten. 12. Mitt.: Xanthalongin, ein neues Xanthanolid aus den Blüten von Arnica longifolia; Planta Med. 37, 325-332 (1979)

WILLUHN, G. u. J. KRESKEN: Sesquiterpenlactone aus Arnica chamissonis; Planta Med. 42, 107 (1981)

WILLUHN, G. u. P.-M. RÜTTGER: Drei neue Helenalinderivate aus Arnicae flos DAB 8; Pharm. Ztg. 126, 2017 (1981)

WILLUHN, G. u. P.-M. RÖTTGER: Helenalin und seine Derivate, die herzwirksamen Verbindungen der Arnikablüten; Planta Med. 45, 131 (1982)

WILLUHN, G., G. PRETZSCH u. D. WENDISCH: Zwei neue Pseudoguaianolide aus den Blüten von Arnica chamissonis Less. subsp. genuina Maguire; Tetrahedron 37, 773-774 (1981)

WILLUHN, G., P.-M. RÖTTGER u. W. QUACK: Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität der Sesquiterpenlactone der Arnikablüten; Pharm. Ztg. 107, 2183-2185 (1982)

WILLUHN, G., J. KRESKEN u. D. WENDISCH: Sesquiterpenlactone aus Arnica chamissonis Less. III: 4-O-Acetyl-6-desoxychamissonolid und 6-O-Propionyl-11,13-dihydrohelenalin, zwei neue, natürlich vorkommende Pseudoguaianolide aus Arnica chamissonis subsp. foliosa; Planta Med., im Druck

WITZEL, D.A., G.W. IVIE u. J.W. DOLLAHITE: Mammalian toxicity of Helenalin, the toxic principle of Helenium microcephalum DC (Smallhead Sneezeweed); Am. J. Vet. Res. 37, 859-861 (1976)

WOODWARD, E.F.: Botanical drugs - A brief review of the industry with comments on recent developments; Econ. Bot. 1, 402-414 (1947)

YANAGITA, M., S. INAYAMA u. T. KAWAMATA: The stereostructures of Pulchellidine and Pulchellin; Tetrahedron Lett. 2, 131-134 (1970a)

YANAGITA, M., S. INAYAMA u. T. KAWAMATA: Neopulchellidine and Neopulchellin; Tetrahedron Lett. 34, 3007-3010 (1970b)

YOSHIOKA, H., T.J. MABRY u. B.N.TIMMERMANN: Sesquiterpene lactones: Chemistry, NMR and plant distribution; University of Tokyo Press, Tokyo (1973)

YOUNGKEN, H.W. u. E.H. WIRTH: A pharmacognostical study of Europaen and American Arnicas; J. Am. Pharm. Assoc. 34, 65-73 (1945)

YOUNGKEN, H.W. u. E.H. WIRTH: Pharmacognostical studies of four American Arnicas; J. Am. Pharm. Assoc. 36, 85-95 (1947)

Lebenslauf

Am 14.9.1953 wurde ich als erstes Kind des Apothekers Dr. Wolfgang Rachel und seiner Ehefrau, der Apothekerin Helga Rachel, geb. Kietz in Aachen geboren.

1960 - 1964 besuchte ich die Volksschule in Düsseldorf und dann bis zum Abitur das Städtische Luisengymnasium. Im Mai 1973 legte ich nach mathematisch-naturwissenschaftlich differenzierter Oberstufe die Reifeprüfung ab.

Im November 1973 nahm ich das Pharmaziestudium an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen auf. Dort bestand ich am 10.12.1975 den ersten und am 15.3.1977 den zweiten Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung.

Von April bis November 1977 absolvierte ich den ersten Teil meiner praktischen Ausbildung in der Schiller - Apotheke in Horb a.N.

Im Dezember 1977 erhielt ich am Institut für Pharmazeutische Biologie in Düsseldorf eine Stellung als wissenschaftliche Hilfskraft und beendete dort meine praktische Ausbildung.

Am 28.4.1978 bestand ich in Stuttgart den dritten Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung. Die Approbation als Apotheker wurde mir am 13.10.1978 erteilt.

Die vorliegende Dissertation entstand unter Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Willuhn am Institut für Pharmazeutische Biologie, an dem ich zum Januar 1979 eine Stelle als wissenschaftliche Angestellte erhielt.

Seit August 1980 bin ich mit dem Apotheker Wilhelm Junior verheiratet.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren Ammon, Auterhoff, Bader, Beyer, Cyran, Graf, Kovar, Krüger, Möllenstedt, Reinhard, Rüdorff, Schultz, Seiler, Willuhn

Copy + Sofortdruck GmbH
4000 Düsseldorf 1 Bilker Allee 173